

Sunuş

Hayvancılık sektörü bakımından büyük bir potansiyele sahip olan ülkemizde bazı hayvan hastalıklarının mevcudiyeti önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Hastalıklarla mücadelede veteriner teşhis ve analiz laboratuvarlarında hızlı ve güvenilir teşhis yapılması erken tedbir alınması açısından son derece önemlidir.

Bu kapsamda veteriner teşhis ve analiz laboratuvarlarının alt yapıları bütçe imkanları doğrultusunda sürekli iyileştirilmeye çalışılmaktadır. Çalışmalar sonucunda, Avrupa Birliği entegrasyonu içerisinde ulusal referans laboratuvar oluşturulmuş ve Bakanlığımız Teşhis ve Analiz Laboratuvarlarının akreditasyonları gerçekleştirilmiştir.

Son yıllarda dünyada ve ülkemizde yeni hastalıkların görülmeye başlaması ve teknolojik gelişmelere paralel olarak hastalıkların teşhisinde yeni metotlar kullanılmaya başlanmıştır. Gerek ülkemizde kullanılan mevcut metotların gerekse uluslararası kabul görmüş yeni teşhis metotlarının tekrar gözden geçirilerek standart operasyon prosedürlerin güncellenmesi amacıyla Bakanlığımız yetkilileri, Veteriner Fakültesi Öğretim Üyeleri ve Enstitü Uzmanlarının koordineli olarak çalışacakları altı adet komisyon oluşturulmuştur. Oluşturulan komite üyelerinin özverili çalışmaları sonucunda teşhis metodu standart operasyon prosedürlerine son hali verilmiş ve tüm komisyonların çalışmaları bir araya getirilerek “Teşhiste Metot Birliği Kitabı” oluşturulmuştur. Tüm Kamu ve Özel Veteriner Teşhis ve Analiz Laboratuvarları bu kitapta yer alan bilimsel komitenin onayını almış teşhis ve analiz metotlarını kullanacak ve bu suretle teşhiste metot birliği sağlanacaktır.

Gerek Bakanlığımız Laboratuvarlarında ve gerekse Bakanlığımızdan ruhsatlı Veteriner Teşhis ve Analiz Laboratuvarlarında yayımlanmış olan bu metotlar uygulanacak olup, analiz sonuçları ulusal referans laboratuvarlar tarafından doğrulandıktan sonra geçerli olacaktır.

Bilimsel komite üyeleri belli zamanlarda bir araya gelip, gelişmeleri takip ederek bünyelerinde çalışmalarına devam edecek ve yeni geliştirilen metotların mevcut kitaba ilavesiyle kitabın güncellenmesi temin edilecektir. Yeni geliştirilen veya ilk defa kullanılacak bir metodun Standart Operasyon Prosedürü oluşturulup bilimsel komitenin onayından geçtikten sonra kullanılmaya başlanacaktır.

AB müktesebatına uyumlaştırma çalışmalarının aktif olarak yürütüldüğü bu günlerde, Genel Müdürlüğümüz, Veteriner Fakültesi Öğretim Üyeleri ve Enstitü Uzmanlarının gayretli çalışmaları sonucu hazırlanan Teşhiste Metot Birliği kitabının ülkemize yararlı olacağını umuyor ve bu konuda emeği geçenlere teşekkür ediyorum.

Dr. M. Mehdi EKER

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanı

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanı
Sayın Dr. M. Mehdi EKER'in himayeleri ile

YÖNETİM KOMİTESİ

Vedat MİRMAHMUTOĞULLARI
Dr. Nihat PAKDİL
Prof. Dr. İrfan EROL
Habib CAN
Dr. Nahit YAZICIOĞLU

GÖREV ALANLAR VE KATKIDA BULUNANLAR (*)

Dr. Funda ALTINÖZ	İrem GÜLAÇTI
Dr. Erhan AKÇAY	Mehmet Fahrettin HOCANOĞLU
Ayşe ATEŞOĞLU	Dr. Uğur KÜÇÜKAYAN
Zeynel ARSLAN	Prof. Dr. Osman KUTSAL
Yusuf AKPINAR	Doç. Dr. Taner KARAOĞLU
Hasan AYDIN	Dr. Gülnur KALAYCI
Prof. Dr. Mehmet AKAN	Kamile KESLER
Hüseyin ATİK	M. Levent KAYNAR
Özlem BAĞCI	Tülay KURT
Halil BAŞARAN	M. Murat MADEN
Dr. Ayşen BEYAZIT	Prof. Dr. Serpil NALBANTOĞLU
Prof. Dr. Emine BAYDAN	Asuman SOYSAL NARİŞAHİN
Dr. Aysel Ünsal BACA	Dr. Taraneh ÖNCEL
Dr. Yasemin COŞKUN	Ümit ÖZDEMİR
Mustafa COŞAR	Doç Dr. T. Çiğdem OĞUZOĞLU
Hüseyin ÇAKIROĞLU	Dr. Buket ÖZYER
Emine ÇİFTÇİ	Dr. Çiğdem PİŞKİN
Dr. Fethiye ÇÖVEN	Ünal PARLAK
Dr. Ahmet DENİZ	Alper SEZGİN
Prof. Dr. K. Serdar DİKER	Dr. Beyhan SAREYYÜPOĞLU
Dr. İffet DİNÇ	Doç. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU
Asiye DAKMAN	Dr. M. Melih SELVER
Dr. Seza ESKİİZMİRLİLER	Yasin ŞEN
A.Turan ERDOĞDU	Dr. Serra TUNALIGİL
Dr. Arife ERTÜRK	Dr. Yavuz ULUSOY
Dr. Mehmet EKİK	Dr. H. Hüseyin ÜNAL
Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ	Prof. Dr. Sevil ATALAY VURAL
Prof. Dr. Bahadır GÖNENÇ	Prof. Dr. Hakan YARDIMCI
Elçin GÜNAYDIN	Dr. Öznur YAZICIOĞLU
Yasin GÜÇLÜ	Dr. Funda YÜZBAŞIGİL
Dr. Ziynet GÜNEN	Dr. Ayşin BAŞSATAN YORUMAZ
Burak GÜNGÖR	Dr. N. Fadime YALÇIN
Dr. Yasemin GÜREL	

(*) Soyadına göre alfabetik dizin

Redaksiyon Komitesi Listesi

Parazitoloji Komisyonu	: Dr. Funda ALTINÖZ Özlem BAĞCI
Bakteriyoloji Komisyonu	: Dr. Seza ESKİİZMİRLİLER Dr. Serra TUNALIGİL
Patoloji Komisyonu	: Dr. Öznur YAZICIOĞLU Dr. Ziyne GÜNEN
Farmakoloji ve Toksikoloji Komisyonu	: Dr. Yasemin COŞKUN Dr. H. Hüseyin ÜNAL
Viroloji Komisyonu	: Doç. Dr. T. Çiğdem OĞUZOĞLU Dr. Arife ERTÜRK
Kanatlı Hastalıkları	: Doç. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU Dr. Fethiye ÇÖVEN

Editör Listesi

Parazitoloji Komisyonu	: Prof. Dr. Serpil NALBANTOĞLU
Bakteriyoloji Komisyonu	: Prof. Dr. K. Serdar DİKER
Patoloji Komisyonu	: Prof. Dr. Sevil ATALAY VURAL
Farmakoloji ve Toksikoloji Komisyonu	: Prof. Dr. Emine BAYDAN
Viroloji Komisyonu	: Doç. Dr. Taner KARAOĞLU
Kanatlı Hastalıkları	: Doç. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU

İÇİNDEKİLER

PATOLOJİ	9
Çok Türde Görülen Hastalıklar	11
ŞAP HASTALIĞI (FOOT AND MOUTH DISEASE)'NİN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	12
BRUSELLOZİS (BRUCELLOSIS)'İN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	16
MAVİ DİL HASTALIĞI (BLUE TONGUE)'NİN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	21
PARATÜBERKÜLOZİS (PARATUBERCULOSIS, JOHNE'S DISEASE)'İN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	25
RİFT VADİSİ HUMMASI HASTALIĞI (RIFT VALLEY FEVER)'NİN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	31
BOVINE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY VE SCRAPIE HASTALIKLARININ ELISA İLE TEŞHİSİ	36
KAMFİLOBAKTERİOZİS (CAMPHYLOBACTERIOSIS)'İN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	40
LEPTOSPIROZİS (LEPTOSPIROSIS)'İN HİSTOPATOLOJİK TESPİTİ	44
LİSTERİOZİS (LISTERIOSIS)'İN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	49
TOKSOPLAZMOZİS (TOXOPLASMOSIS)'İN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	54
TRANSMISSIBLE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY (TSE)'LERİN İMMUNOPEROKSİDAZ BOYAMA METODU İLE TEŞHİSİ	59

TRANSMISSIBLE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY' LERİN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	63
---	----

Sığır Hastalıkları	71
---------------------------	-----------

SIĞIR TÜBERKÜLOZU (BOVINE TUBERCULOSIS)'NUN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	72
--	----

SIĞIRLARDA THEILERIOSIS'İN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	79
--	----

SIĞIR GANGRENLİ NEZLESİ (CORYZA GANGRENOSA BOVUM)'NİN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	84
--	----

SIĞIR VEBASI (RINDER PEST) HASTALIĞI'NIN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	89
--	----

Koyun Keçi Hastalıkları	97
--------------------------------	-----------

EKTİMA (CONTAGIOUS PUSTULAR DERMATITIS) HASTALIĞI'NIN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	98
---	----

KOYUN VE KEÇİ ÇİÇEK HASTALIĞI (SHEEP AND GOAT POX DISEASE)'NİN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	102
---	-----

KÜÇÜK RUMİNANT VEBASI (PESTE des PETITS RUMINANTS) HASTALIĞI'NIN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	107
---	-----

KOYUNLARIN PULMONER ADENOMATOZİSİ (OVINE PULMONARY ADENOMATOSIS)'NİN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	111
---	-----

At Hastalıkları	117
------------------------	------------

TEK TIRNAKLILARDA RUAM (GLANDERS) HASTALIĞI'NIN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	118
--	-----

KISRAK VİRAL ABORTUSU (EQUINE RHINOPNEUMONITIS)'N HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	123
--	-----

ATLARIN VİRAL ARTERİTİSİ (QUINE VIRAL ARTERITIS)' NİN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	127
---	-----

Kanatlı Hastalıkları 133

KANATLI ÇİÇEK (FOWL POX) HASTALIĞI'NIN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	134
--	-----

GUMBORO HASTALIĞI (INFECTIOUS BURSAL DISEASE)'NİN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	138
---	-----

KANATLILARIN İNFEKSİYÖZ LARİNGOTRAHİTİS (AVIAN) HASTALIĞI'NIN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	142
--	-----

KANATLI TÜBERKULOZU (AVIAN TUBERCULOSIS)'NUN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	146
---	-----

KANATLILARDA MAREK HASTALIĞI'NIN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	151
--	-----

Su Hayvanları Hastalıkları 157

BALIKLARDA VIRAL NERVOUS NECROSIS (VIRAL ENCEPHALOPATHY AND RETINOPATHY)'İN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	158
--	-----

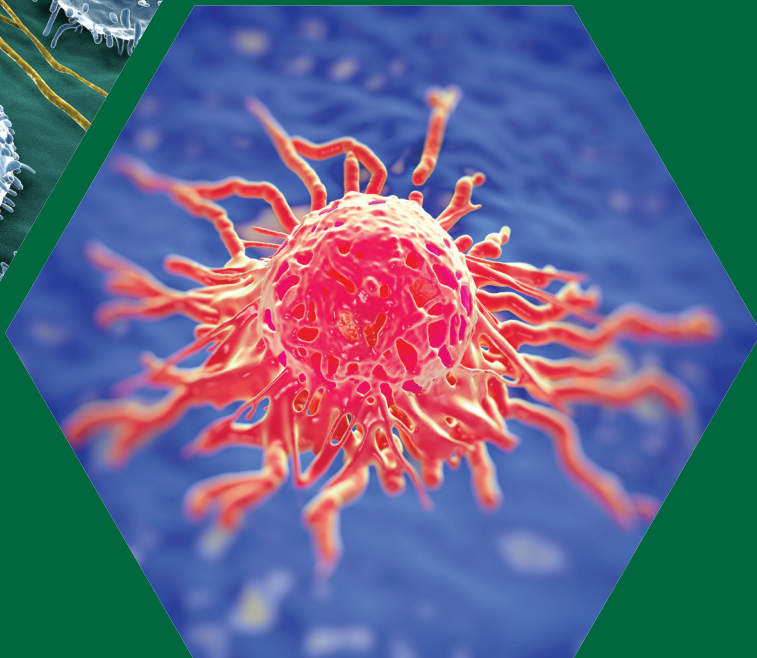
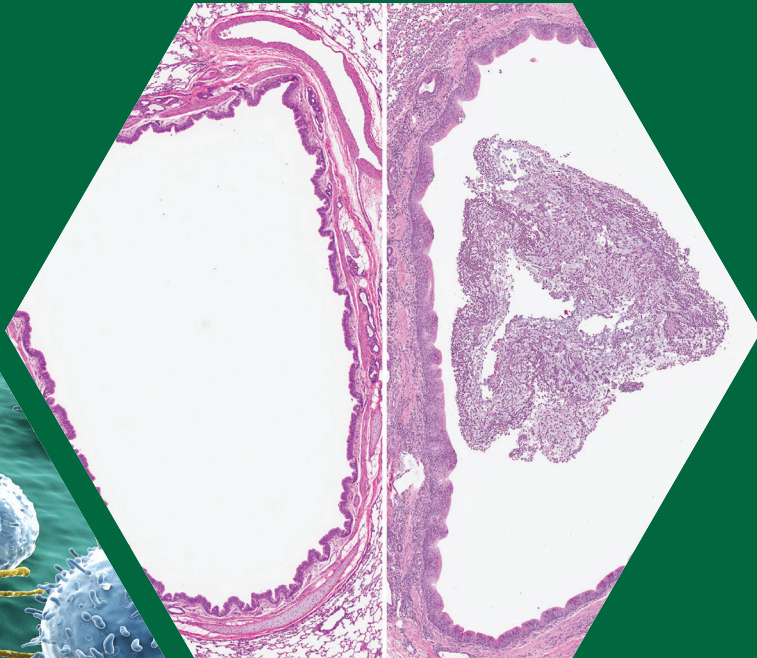
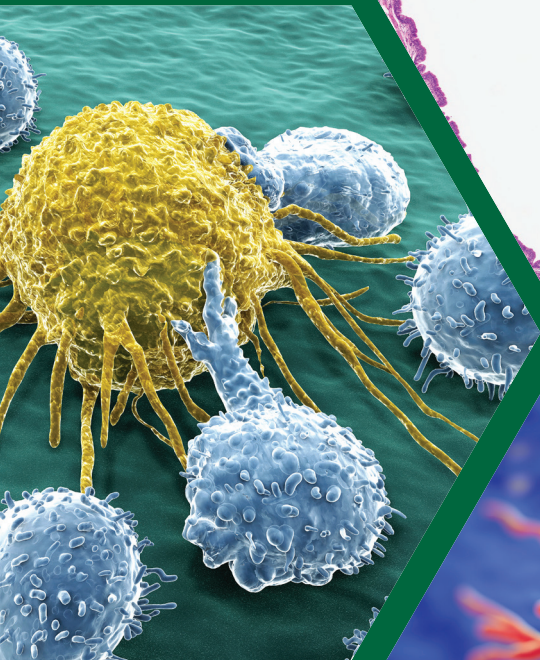
YASSI İSTİRİDYELERDE (OSTREA EDULIS) BONAMIOSIS'İN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	163
---	-----

YASSI İSTİRİDYE (OSTREA EDULIS) VE MİDYELERDE (MYTILUS GALLOPROVINCIALIS) MARTEILIOSIS'İN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	168
--	-----

YASSI İSTİRİDYELERDE (OSTREA EDULIS) MIKROCYTOSIS'İN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	174
--	-----

ÇİFT KABUKLU YUMUŞAKÇALARDA PERKINSOSIS'İN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ	179
--	-----

HİSTOPATOLOJİK İNCELEMELERDE KULLANILAN CİHAZLAR	186
---	-----



PATOLOJI

Çok Türde Görülen Hastalıklar



ŞAP HASTALIĞI (FOOT AND MOUTH DISEASE)'NIN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Başta sığırlar olmak üzere büyük ve küçük ruminantlarda Şap Hastalığı (Foot and Mouth Disease)'nin yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir. Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities” bölümü ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY \(bis\).pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_bis.pdf)) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HE: Hematoksilen-Eosin.

Şap Hastalığı (Foot and Mouth Disease): Etken *Picornavirus* grubundan *Aphthovirus* alt gruplarıdır. Virusun esas giriş ve primer çoğalma yeri üst solunum yolları ve özellikle farinkstir. Burada bir primer aft oluşur ve 3-8 gün süren bir inkübasyon ile çoğalarak 4-5 gün süren bir viremiye neden olur. Viremiyi takiben virus, ağız boşluğu, özellikle dil, meme derisi ve interdigital dokulara yerleşerek burada veziküllerin oluşumuna neden olur.

Hastalık yüksek ateş ve iştahsızlıkla başlar. Ateşin 2-3. gününde bezelye-nohut büyüklüğünde veziküller şekillenir. Bu arada ağızdan iplik tarzında uzayarak akan salya başlar. Hastalığı atlatanlar 2-4 yıl bağıştıktır ve 6 ay portör olabilirler. Hastalığın morbiditesi yüksek, mortalitesi değişkendir.

Veziküllere dudakların iç kısımlarında, diş etlerinde, yanaklarda, sert damakta, dilde, dilin özellikle enlemesine ön 2/3'nin dorsal ve dorsalateralinde, burun, merme ve burun delikleri çevresinde, memede, tırnak bölgesinin korium koronariyumunda, ön midelerde rastlanır. Veziküller sindirim hareketleri ile yırtılır ve yerlerinde erozyonlar kalır. Erozyonlar sekonder bakteriyel bir enfeksiyon meydana gelmezse 5 günde iyileşebilirler.

Genç hayvanlarda myokarditis gelişebilir. Myokarditis vezikül oluşmadan, bazen de vezikül oluşumu ile birlikte görülebilir. Myokarditise ilgili lezyonlar, ventriküler kaslarda, özellikle M. papillarislerde, etrafı hiperemik hafif soluk, nekrotik alanlar şeklinde ortaya çıkar. Bu alacalı görünüşe kaplan postu manzarası denir. Myokarditis olaylarında akut kalp yetmezliğinden dolayı mortalite oranı oldukça yüksektir. Myokarditis sonucu gelişen ölümlerde viremiye ilgili olarak,

kadavrada doğal deliklerden kan sızıntısı olabilir, kanda pıhtılaşma bozuklukları vardır.

Koyun ve keçilerde lezyonlar, daha çok diş dipleri ile dilin arka ve dorsal kesiminde olup genellikle vezikül oluşmadan eroziv-ülseratif karakterdedir. Tipik veziküllere tırnak aralarında rastlanır. Bu nedenle akut salgınlarda belirgin topallık görülür.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Şap hastalığının yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için gerekli mikroskopik bulguları açıklamaktır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilen lezyonlu ağız mukozası kısımları (dil,dudak, yanaklar, damak), tonsiller ve kalp rutin doku işleme yöntemlerine göre işlenerek hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, HE boyası ile boyanır ve ışık mikroskopunda muayene edilir.

7.1. Materyal

Lezyonlu ağız mukozası kısımları (dil, dudak, yanaklar, damak), tonsil ve kalp incelenir.

7.1.1 Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Su Banyosu

Etüv

Boyama seti/ Boyama Cihazı

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

%37-40 formaldehid

Sodyum fosfat monobazik

Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)

Dereceli alkoller (60°, 70°, 80°, 96°)

Absolut alkol 100°

Ksilol

Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)

Hazır Hematoksilen-eosin boyası

Lityum karbonat

Hidroklorik asit

Entellan

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonu

%37-40 formalin	100.0 ml
Distile su	900.0 ml
Sodyum fosfat monobazik	4.0 g
Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)	6.5 g

Doymuş Lityum karbonat

Lityum karbonat	1.0 g
Distile su	100.0 ml

Asit alkol

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asit, konsantre	10.0 ml

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1.Dokuların Tespiti:

Lezyonlu ağız mukozası kısımları (dil, dudak, yanaklar, damak) ve tonsiller, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir.

7.2.2.Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- ☐ Tespit edilen dokular, trimlenerek kasetlere yerleştirilir.
- ☐ Çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- ☐ Dokular, Doku Takip Cihazı'nda dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir; daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 60 ⁰	(120 dakika)
Etanol 70 ⁰	(120 dakika)
Etanol 80 ⁰	(120 dakika)
Etanol 96 ⁰	(120 dakika)
Etanol 96 ⁰	(120 dakika)
Absolut etanol 100 ⁰	(120 dakika)
Absolut etanol 100 ⁰	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol – Parafin	(120 dakika)
Parafin	(120 dakika)

- ☐ En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3.Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56⁰-60⁰'lik etüvde kurutulur.

7.2.4.Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile Kapatılması:

Daha sonra kesitler HE ile boyanarak üzerlerine lamel kapatılır.

Hematoksilen-Eosin Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, önce 3 adet ksilol kaplarında her birinde 5 dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. 2 adet absolut alkol kablarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol uzaklaştırılır ve sırasıyla dereceli alkollerden (96⁰, 80⁰, 70⁰) geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.
2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Instant hematoksin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 4 dakika boyanır.
4. Çeşme suyunda yıkanır.
5. Asit alkolde dekolore edilerek boyanın fazlası alınır.
6. Çeşme suyunda yıkanır.
7. Lityum karbonatlı suda 5 dakika bekletilir.
8. Alkolik Eosin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 1 dakika boyanır.
9. 70⁰'den başlayarak her birinde 2'şer dakika olmak üzere 80⁰ ve 96⁰'lık alkollerden ve absolut alkollerden geçirilerek eosinin fazlası alınır.
10. Ksilol kaplarında 2'şer dakika tutularak alkolden arındırılır ve şeffaflandırılır.
11. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi:

HE ile boyanan doku kesitlerinde; ağız mukozasında özellikle Str. spinosum tabakasında yaygın spongiosis şekillenir. Yer yer epitel hücreleri nekroze olur. Nekrotik hücrelerin sitoplazmaları koagüle ve eozinofiliktir. Mikro ve makroveziküller oluşur. Lamina propria ve dermiste yangısal hücre infiltrasyonları dikkati çeker. Yavrularda kalp kasında hiyalin dejenerasyonu ve nekroz (Zenker dejenerasyonu ve nekrozu) ile lenfosit infiltrasyonları görülür.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- ☐ OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.05_FMD.pdf
- ☐ Brown, C.C., Baker, D.C., Barker, I.K. (2007) Alimentary System, In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Maxie, M.G. (ed), 5th ed., Elsevier Saunders, Edinburg, London, Newyork, Toronto, London, Sydney, Vol:2, p. 135-137.
- ☐ Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd ed., McGraw-Hill Book Company, Newyork, Toronto, London, Sydney, p. 38-39.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

BRUSELLOZİS (BRUCELLOSIS)'İN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Ruminantlarda (özellikle sığır, koyun ve keçilerde) ağırlıklı olarak genital sistemde etkili olan, gebe hayvanlarda abort yapan ve zoonoz olan Bruselloz'un yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir. Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities" bölümü ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY \(bis\).pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_bis.pdf)) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HE: Hematoksilen-Eosin.

Brusellozis (Brucellosis): *Brucella* cinsi bakteriler küçük, Gram-negatif basil ya da kokobasillerdir. Bakteriler hücre içinde yaşar ve hayvanlarda kronik enfeksiyonlara yol açarlar. Persiste ya da tekrarlayan bakteremilerde tipik olarak abortus şekillenir.

Sığırlarda enfeksiyon kaynağı atık fötüs, plasenta ve bulaşık uterus akıntısıdır. Enfeksiyon genellikle sindirim kanalı yoluyla olur. Vagina, konjunktiva ve deri yoluyla da enfeksiyon oluşabilmektedir. Koital enfeksiyona rastlanırsa da bu enfeksiyon şekli çok görülmez; özellikle kronik olgularda, akut olgulara oranla spermada daha az etken bulunur. Enfekte boğalardan alınan sperma ile yapılan suni tohumlamalarla da hastalık bulaşabilmektedir. Enfeksiyonun bulaşma şekline bakılmaksızın hastalığın gelişmesinde hayvanın yaşı, gebe olup olmayışı, kalıtsal direnci, etkenin dozu ve virülensi önem taşımaktadır. Cinsel olgunluğa ulaşma yaşına kadar genç hayvanlar aynı yollarla ve bulaşık sütle enfekte olurlar, ancak birkaç ay içinde hastalığı atlatırlar.

Mikroorganizmalar vücuda girdikleri yere yakın lenf düğümlerine hızla ulaşır ve akut lenfadenitise yol açarlar. Lenf düğümleri büyür, hiperplastik olur, medüller kanamalar şekillenir.

Tekrarlayan bakteremiler sonu etkenler birçok dokuya yayılır ve lokalize olurlar. Etkenler dişilerde dalak, meme bezleri, meme lenf düğümleri ve gebe uterus; erkeklerde ise lenfoid dokular, testis ve eklenti bezlerinde yerleşirler.

Dişi hayvanlarda, etken gebe endometriuma ve fetal plasentaya affinite gösterir. Enfekte gebe uterusun dış görünüşü normaldir. Bazen plasenta da az çok normal görünüşte olur. Tipik olarak, kotiledonlar arasındaki alanlarda endometrium ve korion arasında kokusuz, kirli sarı renkte, az çok yapışkan ve sümüğümsü bir eksudat toplanır. Eksudatın içinde grimsi sarı renkte doku artıkları bulunur. Yavru zarları ve göbek kordonu ödemlidir.

Plasentada görülen lezyonlar uniform olmazlar. Kimi kotiledonlar az çok normal oldukları halde diğerleri nekrotik olur. Kotiledonlar arasındaki plasentada da lezyonların şiddeti değişir. Kotiledonlara yakın olan kısımlarda lezyonlar daha belirgindir. Lezyonlu bölgelerde plasenta sarımtırak jelatinöz infiltrasyon nedeniyle kalınlaşır, mat ve sert bir durum alır. Normalde düz ve parlak olan plasenta sarımtırak gri renkte bir deri görünümündedir. Plasentanın üstünde pıhtılaşmış eksudat parçaları ve dökülmüş epitel hücreleri toplanır. Lezyonlu kotiledonların tümünde ya da bir kısmında nekroz şekillenir. Kıvamları yumuşar ve sarımtırak gri bir renk alırlar. Kotiledonların üzerini yapışkan, kokusuz ve kahverenginde bir eksudat örter.

Fötüs çoğunlukla ödemlidir ve deri altında kanlı bir sıvı toplanır. Fötüsün normal abomazum içeriği saydam, kalınca ve yapışkandır; brusellozda içerik çok bulanık, limon sarısı renginde ve pıhtılı olur. Bu hastalıkta fötüsta görülen en önemli lezyon pnömonidir. Akciğer makroskopik olarak normal görülebilirler, ancak histolojik bakıda bronşit ve bronkopnömoni odaklarına rastlanır. Şiddetli olgularda akciğer büyür ve toraksın şeklini alır. Palpasyonda serttir. Plöra hiperemik ya da hemorajik olur ve üzerinde sarı-beyaz renkte fibrin iplikleri toplanır.

Erkek hayvanlarda akut nekrotik orşitis görülür. Testis oldukça büyümüştür. Tunika vaginalis boşluğu fibrinopurulent eksudatla genişler; parietal ve viseral tunikaların yüzeyleri üzerinde nemli sarı renkli fibrinin oluşturduğu kalın tabaka birikir. Testis ve epididimiste makroskopik olarak nekroz şekillenir.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Ruminantlarda Brusellozis'in yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için gerekli mikroskopik bulguları açıklamaktır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

Uterus, plasenta, fötüse ait dokular, lenf düğümü ve testis gibi organ örnekleri, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir. Tespit edilen örnekler, daha sonra rutin doku işleme yöntemlerine göre işlenir ve hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, Hematoksilen-Eosin (HE) boyası ile boyanarak ışık mikroskobunda muayene edilir.

7.1. Materyal

Uterus, plasenta, fötüse ait dokular, lenf düğümü gibi organ örnekleri incelenir.

7.1.1 Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Su Banyosu

Etüv

Boyama seti / Boyama Cihazı

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

%37-40 formaldehid

Sodyum fosfat monobasic

Sodyum fosfat dibasik (anhidroz)

Dereceli alkoller (60°, 70°, 80°, 96°)

Absolut alkol 100°

Ksilol

Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)

Hazır Hematoksilen-eosin boyası

Lityum karbonat

Hidroklorik asid

Entellan

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonu

%37-40 formalin	100.0 ml
Distile su	900.0 ml
Sodyum fosfat monobasic	4.0 g
Sodyum fosfat dibasik (anhidroz)	6.5 g

Doymuş Lityum karbonat

Lityum karbonat	1.0 g
Distile su	100.0 ml

Asit alkol

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asid, konsantre	10.0 ml

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1.Dokuların Tespiti:

Doku örnekleri, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir.

7.2.2.Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- Tespit edilen dokular, trimlenerek kasetlere yerleştirilir.
- Çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- Dokular, Doku Takip Cihazı'nda dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir; daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 60°	(120 dakika)
Etanol 70°	(120 dakika)
Etanol 80°	(120 dakika)

Etanol 96°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol – Parafin	(120 dakika)
Parafin	(120 dakika)

- En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3.Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56°-60°'lik etüvde kurutulur.

7.2.4.Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile Kapatılması:

Daha sonra kesitler Hematoksilen-Eosin ile boyanarak üzerlerine lamel kapatılır.

Hematoksilen-Eosin Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, önce 3 adet ksilol kaplarında her birinde 5 dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. 2 adet absolut alkol kablarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol uzaklaştırılır ve sırasıyla dereceli alkollerden (96°, 80°, 70°) geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.
2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Instant hematoksilin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 4 dakika boyanır.
4. Çeşme suyunda yıkanır.
5. Asit alkolde dekolore edilerek boyanın fazlası alınır.
6. Çeşme suyunda yıkanır.
7. Lityum karbonatlı suda 5 dakika bekletilir.
8. Alkolik Eosin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 1 dakika boyanır.
9. 70°'den başlayarak her birinde 2'şer dakika olmak üzere 80° ve 96°'lik alkollerden ve absolut alkollerden geçirilerek eosinin fazlası alınır.
10. Ksilol kablarında 2'şer dakika tutularak alkolden arındırılır ve şeffaflandırılır.
11. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi:

En belirgin mikroskobik lezyonlar fötüsün iç organlarındadır. Fötüste hafif ya da şiddetli kataral bronkopnömoni ve fibrinli pnömoninin değişik derecelerine rastlanır. Yangısal hücreler mononükleardır, bazı alanlarda olgun ve olgunlaşmamış nötrofil lökositlere de rastlanır. Fötüste ayrıca, arterlerde (özellikle akciğer damarlarında) nekrotik arteritise ve lenf düğümleri, karaciğer, dalak ve böbreklerde fokal nekroz odakları ile dev hücreli granülomlara rastlanır.

Lenf düğümlerinde sinuslar nötrofil ve eozinofil lökositler ile infiltredir. Germinal merkezler belirginleşir. Medulla sinuslarında giderek plazma hücreleri toplanır. Etkenler bazen sinovial dokularda yerleşerek purulent tendovaginitise, artritise ya da bursitise yol açarlar.

Ödemli olan plasentanın stromasında çok sayıda mononükleer hücre ve az olarak da nötrofiller toplanır. Korionik epitel hücreleri bakterilerle doludur. Bu epitel hücrelerinin çoğu uterus-korion boşluğuna dökülür. Plasentomların üzerinde plasentitis şekillenir. Plasentanın villuslar arasındaki kısmında şiddetli bir yangı göze çarpar.

Enfeksiyonun başlangıcında endometriumda çok az değişiklik göze çarpar. Zona bazalis'te lenfosit ve plazma hücrelerinde artış olur ve epitelioid hücrelerden oluşan mikroskobik granülomlara rastlanır. Başlangıçta karunküller arasındaki epitel normaldir. Sonradan şiddetli bir endometritis şekillenir.

Nekrotik orşitis brusellozisin karakteristiğidir.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.03_BOVINE_BRUCCELL.pdf http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.02_CAPRINE_OVINE_BRUC.pd http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.09_OVINE_EPID.pdf
- Schlafer, D.H., Miller, R.B. (2007) Female Genital System. In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Maxie, M.G. (ed), 5th ed., Elsevier Saunders, Edinburg, London, Newyork, Toronto, London, Sydney, Vol:3, p. 484-489.
- Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd ed., McGraw-Hill Book Company, Newyork, Toronto, London, Sydney, p. 38-39.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

MAVİ DİL HASTALIĞI (BLUETONGUE)'NIN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Özellikle koyunlar başta olmak üzere, keçilerde, sığırlarda, yabani ruminatlarda ve develerde Mavi Dil Hastalığı'nın yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir. Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities" bölümü ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_\(bis\).pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_(bis).pdf)) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HE: Hematoksilen-Eosin.

Mavi Dil Hastalığı (Bluetongue): *Orbivirus* grubundan *Reovirus*'ların oluşturduğu, akut seyirli, yüksek ateş, dolaşım bozuklukları, oral ve nazal mukozalarda ödem, hiperemi ve ülserasyonlarla karakterize viral bir hastalıktır. Mavi dil özellikle koyunlar başta olmak üzere keçilerde, sığırlarda, yabani ruminatlarda ve develerde görülür. Koyunlarda merinos ırkı daha duyarlıdır.

Virus, *Cluoides* spp. türü sivrisineklerle aktarılır. Genellikle yaz sonlarında ve sonbahar aylarında görülür. Virus, sinek ısırmasından sonra bölgesel lenf düğümleri ile dalakta çoğalır, viremi şekillenir, daha sonra arteriol, venül ve kapıllarlarda sekonder enfeksiyon şekillenir.

Perakut veya akut formda yüksek ateşle başlar, ateşle birlikte oral ve nazal mukozalarda kızarıklık ve akıntı ile dudakta ve dilde emme hareketleri görülür. Bu aşamada dudakta, dilde ödem ve siyanotik renk değişikliği görülür. Siyanozun nedeni özellikle venüllerdeki mikrovasküler trombozlardır. Dil şişkin ve dışarıdadır. Ağız mukozasında önce ekimoz ve peteşiler, sonra erozyon ve ülserler gelişir. Ağız mukozasındaki erozyon ve ülserler muntazam ve uzunlamasına. Lezyonlar en çok yanak mukozası ve dil kenarlarına yerleşir. Dil gangrenli bir hal alabilir.

Ayakta laminitis ve buna ilgili topallık vardır. Korium koranaryum bölgesinde konjesyon belirgindir. Hastalığı atlatanlarda bu bölgede birbirine paralel kahvemsî çizgiler meydana gelir. Hastalık üç hafta veya daha fazla sürer.

Nekropside ağızdaki lezyonların yanı sıra, kalbin sol ventrikulusunda, myokardın çeşitli bölgelerinde, özellikle musculus papillarisde derin nekrozlar vardır. A. pulmonalisin başlangıç kısmının media

tabakasında şekillenen 1 cm genişliğinde 2-3 cm uzunluğundaki fokal kanamalar karakteristiktir. Benzeri kanamalar, Aort'un çıkış yerindeki subepikardial ve subendokardial bölgelerde de görülür. Akciğerlerde konjesyon ve ödem ile farinks ve larinkste ödem ve peteşiyal yada ekimotik kanamalar vardır.

Farinks ve özofagusdaki myodejenerasyonlar disfaji ve regurgitasyona neden olur ve bununla ilgili olarak da aspirasyon pnömonisi meydana gelebilir.

Gebe hayvanlarda plasentayı geçen virus, fötüsta akut nekrotik meningoencephalitise neden olarak teratojenik etki gösterir.

Virus fötüsü gebeliğin ilk 1/3'inde etkilerse hidranensefali, poreensefali, retinal displazi ile birlikte bu hayvanlarda artrogripozis; ikinci 1/3'lik dönemde etkilerse poreensefali; son 1/3'inde etkilerse hafif fokal meningoensefalitis şekillenir.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Mavi Dil Hastalığı'nın yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için gerekli mikroskobik bulguları açıklamaktır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilen lezyonlu ağız mukozası kısımları (dil, dudak, yanaklar, damak) ve tonsiller, rutin doku işleme yöntemlerine göre işlenerek hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, HE boyası ile boyanır ve ışık mikroskobunda muayene edilir.

7.1. Materyal

Lezyonlu doku örneklerinden özellikle dil, dudak, yanaklar, damak, tonsil ve kalp incelenir.

7.1.1 Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Su Banyosu

Etüv

Boyama seti/ Boyama Cihazı

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

%37-40 formaldehid

Sodyum fosfat monobazik

Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)

Dereceli alkoller (60°, 70°, 80°, 96°)

Absolut alkol 100°

Ksilol

Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)

Hazır Hematoksilen-eosin boyası

Lityum karbonat

Hidroklorik asit

Entellan

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonu

%37-40 formalin 100.0 ml

Distile su 900.0 ml

Sodyum fosfat monobazik 4.0 g

Sodyum fosfat dibazik (anhidröz) 6.5 g

Doymuş Lityum karbonat

Lityum karbonat 1.0 g

Distile su 100.0 ml

Asit alkol

Alkol %70 1000.0 ml

Hidroklorik asit, konsantre 10.0 ml

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1.Dokuların Tespiti:

Lezyonlu ağız mukozası kısımları (dil, dudak, yanaklar, damak), %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir.

7.2.1.Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- Tespit edilen dokular, trimlenerek kasetlere yerleştirilir.
- Çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- Dokular, Doku Takip Cihazı'nda dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir; daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 60° (120 dakika)

Etanol 70° (120 dakika)

Etanol 80° (120 dakika)

Etanol 96° (120 dakika)

Etanol 96° (120 dakika)

Absolut etanol 100° (120 dakika)

Absolut etanol 100° (120 dakika)

Ksilol (120 dakika)

Ksilol (120 dakika)

Ksilol (120 dakika)

Ksilol – Parafin (120 dakika)

Parafin (120 dakika)

- En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3.Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56°-60°'lik etüvde kurutulur.

7.2.4.Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile Kapatılması:

Daha sonra kesitler HE ile boyanarak üzerlerine lamel kapatılır.

Hematoksilen-Eosin Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, önce 3 adet ksilol kaplarında her birinde 5 dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. 2 adet absolut alkol kaplarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol uzaklaştırılır ve sırasıyla dereceli alkollerden (96°, 80°, 70°) geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.
2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Instant hematoxilen (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 4 dakika boyanır.
4. Çeşme suyunda yıkanır.
5. Asit alkolde dekolore edilerek boyanın fazlası alınır.
6. Çeşme suyunda yıkanır.
7. Lityum karbonatlı suda 5 dakika bekletilir.
8. Alkolik Eosin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 1 dakika boyanır.
9. 70°'den başlayarak her birinde 2'şer dakika olmak üzere 80° ve 96°'lik alkollerden ve absolut alkollerden geçirilerek eosinin fazlası alınır.
10. Ksilol kaplarında 2'şer dakika tutularak alkolden arındırılır ve şeffaflandırılır.
11. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi:

Mikroskobik olarak ağız mukozasında eroziv ve ülseratif değişiklikler dikkati çeker. Ayrıca lezyonlu bölgelerdeki arteriol ve venüllerde tromboz, ödem ile kanamalar vardır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.03_BLUETONGUE.pdf
- Brown, C.C., Baker, D.C., Barker, I.K. (2007) Alimentary System. In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Maxie, M.G. (ed), 5th ed., Elsevier Saunders, Edinburg, London, Newyork, Toronto, London, Sydney, Vol:2, p. 159-162.
- Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd ed., McGraw-Hill Book Company, Newyork, Toronto, London, Sydney, p. 38-39.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

PARATÜBERKÜLOZİS (PARATUBERCULOSIS, JOHNE'S DISEASE)'İN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Başta sığır, koyun ve keçiler olmak üzere evcil ve yabani ruminantlarda Paratüberkülozis'in (Paratuberculosis, John's Disease)'in yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir. Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities" bölümü ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_\(bis\).pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_(bis).pdf)) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HE: Hematoksilen-Eosin

ZN: Ziehl-Neelsen

Paratüberkülozis (Paratuberculosis): Geviş getirenlerin bir hastalığı olup *Mycobacterium avium paratuberculosis* tarafından oluşturulur. Hastalık domuz ve atlarda da deneysel olarak meydana getirilmiştir; spontan hastalık ender olarak tek tırnaklılarda görülür. Enfeksiyona duyarlılık açısından kritik yaş 6 aydır. Ancak hastalık çoğunlukla 2 yaşındaki ya da daha yaşlı sığırlarda görülür.

Alimenter yolla alınan etkenler, mukozayı geçerek makrofajlarda çoğalır. Bakterilere başlangıçta Peyer plaklarında rastlanır. Her ne kadar en belirgin lezyonlara ileum, kalın bağırsak ve bölge lenf düğümlerinde rastlanırsa da para generalize bir hastalıktır. Hastalığın tipik klinik bulgusu şiddetli ve sıvı şeklinde ishal olup dışkı ıktısız dışarı atılır. Klinik bulgular süreklilik göstermeyebilir ve zaman zaman bulgular kaybolur ya da geriler. Hayvanlarda iştihâ normal olmasına karşın, zayıflama progresiftir ve hastalık ölümle sonuçlanır.

İlerlemiş olgularda, nekropside ileri derecede zayıflama, kaslarda küçülme, yağ depolarında seröz atrofi, intermandibular ödem ve vücut boşluklarında sıvı birikimi göze çarpar. Bağırsakta ve ilgili lenf düğümlerinde spesifik lezyonlar görülür.

Bağırsakta lezyonlara duodenumdan rektuma kadar rastlanabilir. İleumun son kısmında ve kalın bağırsakların başlangıcında lezyonlar daha belirgindir. Bağırsak mukozası diffuz olarak kalınlaşır

ve enine kıvrımlar gösterir. Mukoza kalınlaşması iyi gelişmişse kıvrımlar çekmekle düzeltilemez. Mukoza kıvrımlarının üst kenarları konjesyon ya da peteşial kanamalar nedeniyle kırmızı renktedir ve mukoza bir kadifeyi andırır. Mezenterik lenf düğümleri, özellikle ileosekal olanlar daima büyür, soluk görünüşte ve ödemli olur. Lenfangitis yaygındır. Lenf damarları kalın bir kordon şeklinde bağırsak serozasından mezenterik lenf düğümlerine kadar uzanır. Çoğu zaman görülebilen tek lezyon lenfangitistir. Bu özel bir değişiklik olup nekropside hastalığın tanısına yardımcı olur.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Evci ve yabancı ruminantlarda Paratüberkülozis'in yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için gerekli mikroskopik bulguları açıklamaktır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

Çok sayıda farklı bağırsak kısımları (özellikle terminal ileum ve ileosekal valvül olmak üzere jejunum, duodenum, sekum, kolon, rektum) ve mezenterial lenf düğümleri %10 nötral bufferli formalin solüsyonunda tespit edilir. Daha sonra rutin doku işleme yöntemlerine göre işlenerek hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, patognomonik Paratüberküloz lezyonları yönünden HE ve aside dirençli bakteriler yönünden ZN boyama metotları ile boyanarak ışık mikroskopunda muayene edilir.

7.1. Materyal

Nekropside makroskopik olarak kalınlaşma ve kıvrımlanma tespit edilen ya da şüphelenilen bağırsak kısımları ile mezenterial lenf düğümleri incelenir.

7.1.1 Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Su Banyosu

Etüv

Boyama seti/ Boyama cihazı

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

%37-40 formalin

Sodyum fosfat monobazik

Sodyum fosfat dibasik (anhidroz)

Dereceli alkoller (60°, 70°, 80°, 96°)

Absolut alkol 100°

Ksilol

Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)

Hazır Hematoksilen-eosin boyası

Lityum karbonat

Hidroklorik asit
Entellan
Fenol kristal
Bazik fuksin
Sülfürik asit
Metilen mavisi

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonu

%37-40 formalin	100.0 ml
Distile su	900.0 ml
Sodyum fosfat monobazik	4.0 g
Sodyum fosfat dibazik (anhidröz)	6.5 g

Doymuş Lityum karbonat

Lityum karbonat	1.0 g
Distile su	100.0 ml

%1Asit alkol solüsyonu

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asit, konsantre	10.0 ml

Carbol fuksin solüsyonu

Fenol kristal (çözülmüş)	2.5 ml.
Alkol, %100	5.0 ml.
Bazik fuksin	0.5 gr.
Distile su	50.0 ml.

Kullanımdan önce filtre edilir.

%1 Sülfürik asit solüsyonu

Sülfürik asit, konsantre	1.0 ml
Distile su	100.0 ml

Metilen mavisi solüsyonu (stok)

Metilen mavisi	1.4 g
Alkol, %96	100.0 ml

Metilen mavisi solüsyonu (çalışma)

Metilen mavisi solüsyonu (stok)	10.0 ml
Çeşme suyu	90.0 ml

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1. Dokuların Tespiti:

Lezyonlu bağırsak kısımları ve mezenteriyal lenf düğümleri, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir.

7.2.2. Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- Tespit edilen dokular, trimlenerek kasetlere yerleştirilir.
- Çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- Dokular, Doku Takip Cihazı'nda dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir; daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 60 ⁰	(120 dakika)
Etanol 70 ⁰	(120 dakika)
Etanol 80 ⁰	(120 dakika)
Etanol 96 ⁰	(120 dakika)
Etanol 96 ⁰	(120 dakika)
Absolut etanol 100 ⁰	(120 dakika)
Absolut etanol 100 ⁰	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol – Parafin	(120 dakika)
Parafin	(120 dakika)

- En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3. Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56⁰-60⁰'lik etüvde kurutulur.

7.2.4. Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile Kapatılması:

Daha sonra kesitler Hematoksilen-Eosin boyası ve Ziehl-Neelsen boyama tekniği ile boyanarak üzerlerine lamel kapatılır.

Hematoksilen-Eosin Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, önce 3 adet ksilol kaplarında her birinde 5 dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. İki adet absolut alkol kaplarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol uzaklaştırılır ve sırasıyla dereceli alkollerden (96⁰, 80⁰, 70⁰) geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.
2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Instant hematoksislen (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 4 dakika boyanır.
4. Çeşme suyunda yıkanır.

5. Asit alkolde dekolore edilerek boyanın fazlası alınır.
6. Çeşme suyunda yıkanır.
7. Lityum karbonatlı suda 5 dakika bekletilir.
8. Alkolik Eosin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 1 dakika boyanır.
9. 70⁰den başlayarak her birinde 2'şer dakika olmak üzere 80⁰ ve 96⁰lik alkollerden ve absolut alkollerden geçirilerek eosinin fazlası alınır.
10. Ksilol kaplarında 2'şer dakika tutularak alkolden arındırılır ve şeffaflandırılır.
11. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

Doku kesitlerinde Ziehl-Neelsen Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, distile suya kadar ksilol ve dereceli alkol serilerinden geçirilerek parafinden arındırılır ve dehidre edilir.
2. Karbol fuksin solüsyonunda 30 dakika boyanır.
3. Çeşme suyunda iyice yıkanır.
4. Kesitler açık pembe oluncaya kadar asit alkol solüsyonunda dekolore edilir.
5. Çeşme suyunda 8 dakika yıkanır.
6. Kesitler, açık mavi oluncaya kadar çalışma metilen mavisi solüsyonunda boyanır.
7. Çeşme suyunda yıkanır ve distile suda çalkalanır.
8. Dereceli alkol serileri, absolut alkol ve ksilollerden geçirilir.
9. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

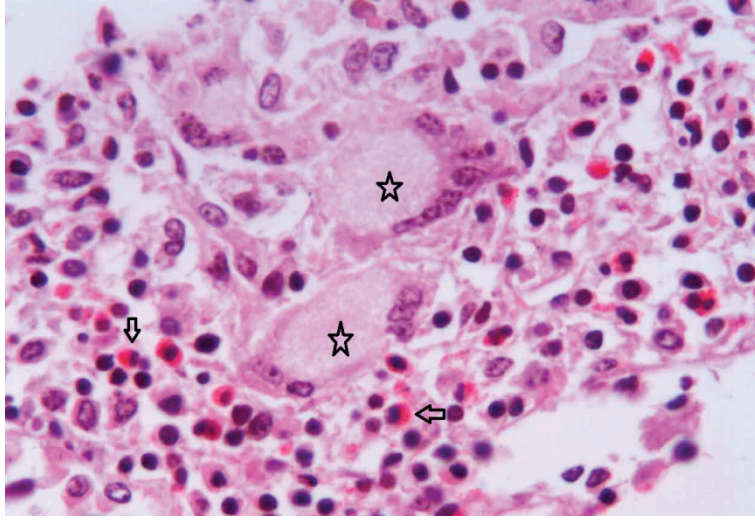
Karakteristik mikroskopik değişiklik granüloamatöz transmural enteritistir. Makroskopik lezyonların hafif olduğu ya da seçilemediği olgularda, lamina propria'da lenfosit, plazma hücresi ve eozinofillerin diffuz infiltrasyonu görülür. Az sayıda makrofaj bulunabilir. En karakteristik değişiklik ise submukoza ile submukozal ve mezenterik lenf damarlarında lenfosit ve plazma hücre infiltrasyonudur.

Tipik olgularda villuslar az çok atrofiye uğrar. Villuslarda ve lamina propria'nın alt kısımlarında fokal ya da diffuz dağılım gösteren makrofajlara rastlanır. Dev hücreleri görülebilir. Yangısal hücre infiltrasyonları kriptleri birbirinden ayırır (Resim 1). Epitelioid makrofaj topluluklarına submukozada da rastlanır. Sığırlarda kazeifikasyon ve kalsifikasyon hemen hemen hiç görülmez.

Paratüberküloziste en belirgin değişikliklerden biri lenfangitistir. Başlangıçta lenf damarları çevresinde lenfosit ve plazma hücreleri toplanır ve lumende epitelioid hücre kümelerine rastlanır. İlerlemiş olgularda mezenterik lenf düğümlerinde granüloamatöz lenfadenitis görülür.

Paratüberküloziste etkenin izole edildiği organlar içinde yalnızca karaciğer, karaciğer lenf düğümleri ve çok ender olarak böbrek ve akciğerde lezyonlar tanımlanmıştır. Bunlar karakteristik fokal granülomlardır. Karaciğerde portal aralıklarda ve lobüller içinde lenfosit ve epitelioid hücre topluluklarına rastlanır.

ZN ile boyanan doku kesitlerinde, açık mavi boyanmış zeminde epitelioid hücreler ile Langhans tipi dev hücrelerin sitoplazmalarında ya da ekstraselüler olarak tek ya da kümeler halinde kırmızı renkli aside dirençli bakteriler gözlenir.



Resim 1. Dev hücreleri (yıldızlar) ve yangısal hücre infiltrasyonları (oklar), Paratüberküloz, İleum, HE, x400 (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Arşivi).

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.11_PARATB.pdf
- Brown, C.C., Baker, D.C., Barker, I.K. (2007) Alimentary System, In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Maxie, M.G. (ed), 5th ed., Elsevier Saunders, Edinburg, London, Newyork, Toronto, London, Sydney, Vol:2, p. 222-225.
- Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd ed., McGraw-Hill Book Company, Newyork, Toronto, London, Sydney, p. 38-39, 220.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

RİFT VADİSİ HUMMASI HASTALIĞI (RIFT VALLEY FEVER)'NİN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Afrika'da geniş getirenlerde ve insanlarda görülen Rift Vadisi Humması Hastalığı (Rift Valley Fever)'nin yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir. Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities" bölümü ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY \(bis\).pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_(bis).pdf)) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HE: Hematoksilen-Eosin.

Rift Vadisi Humması (Rift Valley Fever): Afrika'da geniş getirenlerde ve insanlarda görülen perakut ya da akut seyirli zoonotik bir hastalıktır. *Phlebovirus* genusunda yer alan ve tek bir serotipi bulunan *Bunyavirus* tarafından meydana getirilir. *Culex* ve *Aedes* cinsi sivrisinekler tarafından bulaştırılır. Sığır, koyun ve keçilerde hastalık çok şiddetlidir. Gebe hayvanlarda abortusa ve yeni doğanlarda yüksek mortalite oranlarına sebep olur. Gebe olmayan daha yaşlı hayvanlar, enfeksiyona duyarlı olmalarına rağmen klinik hastalığa daha dirençlidirler. Farklı ırktan hayvanların hastalığa duyarlılığı büyük ölçüde değişir. Develerde enfeksiyon belirsiz olmasına karşın abortus oranları sığırlardaki kadar yüksek olabilir. Mandalar da belirsiz enfeksiyon süresince atık yapabilirler.

İnsanlar, enfekte materyal ile temas yoluyla ya da sivrisinek ısırıklarıyla enfeksiyona duyarlıdır. Nispeten küçük bir hayvan konakçı popülasyonunun bulunduğu ülkelerde vektörler tarafından insanların enfeksiyonu dikkat çekici bir özelliktir. Böyle bölgelerde hastalık ilk olarak insanlarda ortaya konabilir. Laboratuvar çalışanlarında ciddi hastalığa neden olduğundan yüksek seviye biyogüvenlik altında çalışılmalıdır.

Epidemiler süresince, insanlardaki hastalık ile birlikte genç hayvanlar arasında çok sayıda abortus ve ölümlerin görülmesi tipiktir. Kuzularda inkübasyon süresi 12- 36 saattir. 41°C ye varan bifazik ateş vardır ve ölümden kısa süre öncesine kadar yüksek kalır. Etkilenen hayvanlar hareket etmeye ve yem yemeye isteksizdirler, yüzlek lenf düğümleri şişer ve abdominal ağrı vardır. Kuzular hastalık

bulgularının başlangıcından sonra nadiren 36 saatten fazla yaşarlar. İki haftalıktan büyük hayvanlar perakut ya da akut olarak ölebilir ya da belirsiz bir enfeksiyon geliştirebilirler. Bazı hayvanlar melena, kanlı kötü kokulu diyare, kana boyanmış mukopurulent burun akıntısı gösterebilir. İkterus bazen ve özellikle sığırlarda görülebilir. Bu bulguların yanısıra ergin sığırlar lakrimasyon, salivasyon ve sütte bozulma gibi bulgular gösterebilir. Sığırlarda ölüm oranı %10'dan azdır.

Tüm türlerde hepatik lezyonlar çok benzerdir. Atık fütüs ve yenidoğan kuzularda karaciğer büyümüş, yumuşak, sarımsı-kahveden düzensiz konjesyonlu yamalarla bezenmiş koyu kırmızı-kahve renge kadar değişir. Parankimde kolayca fark edilemeyebilen çok sayıda gri-beyaz renkli nekrotik odaklar bulunur. Ergin koyunlarda lezyonlar daha az şiddetlidir. Toplu iğne başı büyüklüğünde kırmızımsıdan gri-beyaza kadar değişen nekrotik odaklar, parankim boyunca dağılmıştır. Safra kesesi duvarında kanama ve ödem yaygındır. Kuzularda karaciğer lezyonları, hemen her zaman abomasum mukozasında çok sayıda küçük kanamalarla eşlik edilir. İnce bağırsak ve abomasum içerikleri de kısmen sindirilmiş kandan dolayı koyu çikolata rengindedir. Tüm hayvanlarda dalak ve perifer lenf düğümleri büyümüş, ödemli ve peteşiler ile bezenmiştir.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Rift vadisi humması hastalığının yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için gerekli mikroskopik bulguları açıklamaktır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

Lezyonlu karaciğer örneği, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir. Tespit edilen örnekler, daha sonra rutin doku işleme yöntemlerine göre işlenir ve hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, HE boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda muayene edilir. Histolojik doku kesitlerinde; hepatositlerde dejenerasyon, nekroz, bazen kireçlenme ve intranuklear eozinofilik inklüzyon cisimciklerinin varlığı aranır.

7.1. Materyal

Fokal nekrozların görüldüğü karaciğer örneği.

7.1.1 Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Su Banyosu

Etüv

Boyama seti / Boyama Cihazı

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

%37-40 formaldehid

Sodyum fosfat monobasic

Sodyum fosfat dibasik (anhidroz)

Dereceli alkoller (60°, 70°, 80°, 96°)
Absolut alkol 100°
Ksilol
Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)
Hazır Hematoksilen-eosin boyası
Lityum karbonat
Hidroklorik asid
Entellan

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonu

%37-40 formalin	100.0 ml
Distile su	900.0 ml
Sodyum fosfat monobasic	4.0 g
Sodyum fosfat dibasik (anhidroz)	6.5 g

Doymuş Lityum karbonat

Lityum karbonat	1.0 g
Distile su	100.0 ml

Asit alkol

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asid, konsantre	10.0 ml

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1.Dokuların Tespiti:

Lezyonlu karaciğer örneği, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir.

7.2.2.Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- Tespit edilen dokular, trimlenerek kasetlere yerleştirilir.
- Çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- Dokular, Doku Takip Cihazı'nda dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir; daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 60°	(120 dakika)
Etanol 70°	(120 dakika)
Etanol 80°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)

Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol – Parafin	(120 dakika)
Parafin	(120 dakika)

- En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3.Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56⁰-60⁰'lik etüvde kurutulur.

7.2.4.Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile Kapatılması:

Daha sonra kesitler Hematoksilen-Eosin ile boyanarak üzerlerine lamel kapatılır.

Hematoksilen-Eosin Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, önce 3 adet ksilol kaplarında her birinde 5 dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. 2 adet absolut alkol kaplarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol uzaklaştırılır ve sırasıyla dereceli alkollerden (96⁰, 80⁰, 70⁰) geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.
2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Instant hematoksilin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 4 dakika boyanır.
4. Çeşme suyunda yıkanır.
5. Asit alkolde dekolore edilerek boyanın fazlası alınır.
6. Çeşme suyunda yıkanır.
7. Lityum karbonatlı suda 5 dakika bekletilir.
8. Alkolik Eosin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 1 dakika boyanır.
9. 70⁰'den başlayarak her birinde 2'şer dakika olmak üzere 80⁰ ve 96⁰'lik alkollerden ve absolut alkollerden geçirilerek eosinin fazlası alınır.
10. Ksilol kaplarında 2'şer dakika tutularak alkolden arındırılır ve şeffaflandırılır.
11. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi:

Histopatolojik muayenelerde; hepatik nekroz hayvan ve insanlarda en belirgin lezyondur. Sığır ve koyunların yeni doğanları ve fütüslerinde, nekroz odakları, fibrin ve yangısal hücre infiltrasyonu görülebilir. Çoğu hepatositlerde şiddetli litik nekroz vardır. Karaciğerin normal yapısı kaybolur. Etkilenen karaciğerlerin yaklaşık %50'sinde intranuklear eozinofilik oval ya da çubuk şekilli inkluzyon cisimcikleri bulunur. Nekrotik hepatositlerde kireçlenme de görülebilir. Yaşlı hayvanlarda hepatik nekroz daha az diffuzdur. İkterus koyunlarda kuzulardakinden daha yaygındır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.14_RVF.pdf
- Maxie, M.G., Youssef, S. (2007) Nervous System, In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Maxie, M.G. (ed), 1st ed., Elsevier Saunders, Edinburg, London, Newyork, Toronto, London, Sydney, Vol:1, p. 318-319.
- Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forced Institute of Pathology, 3rd ed., McGraw-Hill Book Company, Newyork, Toronto, London, Sydney, p. 38-39.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

BOVINE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY (BSE) VE SCRAPIE HASTALIKLARI'NIN ELISA İLE TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Şıgırlarda Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) ile koyun ve keçilerde Scrapie Hastalıkları'nda prion proteinlerinin, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) yöntemi ile saptanmasıdır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir. BSE ve Scrapie hastalıkları için hızlı test olarak kullanılır.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities” bölümü ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY\(bis\).pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY(bis).pdf)) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE)'ler için temel biyogüvenlik önlemleri aşağıda belirtilmiştir.

Materyal	Uygulama
Hayvansal ürünler	-Yakılarak imha edilir.
Katı atıklar (kağıt havlu vb.)	-Yakılarak imha edilir.
Tek kullanımlık araç-gereçler	-Plastik gibi yakılabilen malzemeler yakılarak imha edilir ya da - %2'lik klorinde 20°C'de 1 saat bekletilir ve ardından atılır.
Tekrar kullanılacak malzemeler	-Bu malzemeler kullanımdan sonra temizleme ve dekontaminasyon işlemine kadar ıslak tutulmalıdır. -Malzemeler kağıt havlu ile silinir, %2'lik klorinde 20°C'de 1 saat bekletilir.
Sıvılar	-Yakılarak imha edilir ya da -Beyazlatıcı olarak kullanılan klorinlerin %2'lik konsantrasyondaki çözeltisi ile karıştırılarak 1 saat bekletilir.
Bulaşık yüzeyler	-Yüzeyler temizlendikten sonra 20°C'de 1 saat %2'lik klorin solusyonu ile kaplanarak 1 saat bekletilir ve sonra yıkanır.

- ☐ Kiti ve tüm reagentları +2 °C - +8 °C'de muhafaza edilmelidir.
- ☐ Tüm reagentlar kullanılmadan önce +18°C - 25 °C C'lik oda sıcaklığına getirilmelidir.
- ☐ Tüm açıklamalar dikkatlice okunup izlenmelidir.
- ☐ Kullanılmamış pleyt gözleri kapatılarak kapalı bir plastik torba içinde +2 °C - +8 °C' de saklanmalıdır.
- ☐ Farklı batch'lerdeki (farklı zamanlarda üretilen) kitlerin malzemelerini ve kılavuz kitapçıkları karıştırılmamalıdır.
- ☐ Reagentlarla çalışırken dikkatli olunmalıdır. Son kullanma tarihi geçmiş kit kullanılmamalıdır.
- ☐ Her örnek için ayrı pipet ucu kullanılmalıdır.
- ☐ Her test serisinde hem negatif hem de pozitif kontrol kullanılmalıdır.
- ☐ Substrat solüsyonunun göz, solunum sistemi ve deri üzerinde tahriş edici etkisi vardır. Deri ve gözlerle temasından kaçınılmalıdır.
- ☐ Stop solüsyonu kuvvetli bir asit olup, yanıklara sebep olabilen H₂SO₄ içerir. Dikkatli çalışılmalıdır.
- ☐ Ağızla pipetleme yapılmamalıdır.
- ☐ Bu kit sadece in vitro teşhis amacıyla kullanılmalıdır.
- ☐ Kit prosedürü takip edilmelidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

BSE: Bovine Spongiform Encephalopathy

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

TSE: Transmissible Spongiform Encephalopathy

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Antikor, katı bir faza bağlanır. ELISA'da katı faz olarak mikropleyt kullanılır. Şüpheli materyal, antikor bağlanmış olan gözlere konulur ve antijen-antikor kompleksinin oluşabilmesi için optimum şartlarda belirli bir süre tutulur. Ortama daha sonra enzim ile konjuge edilmiş konjugat ilave edilir. Test sonucunun görünür hale getirilebilmesi için konjugata uygun bir substrat ortama eklenerek renkli son ürün oluşumu takip edilir. Kullanılan kit protokolüne göre okuyucuda okutulan sonuçlar değerlendirildikten sonra negatif/ pozitif şeklinde rapor edilir.

7. TEST METODUNUN TANIMI

Prion proteinlerinin varlığının, ELISA ile saptanmasıdır.

7.1. Materyal

Büyük ve küçük ruminantlarda beyin kökü sağ veya sol obex bölgesi ile küçük ruminantlarda lenf dokusu veya dalak incelenir.

7.1.1. Kullanılan Ekipman

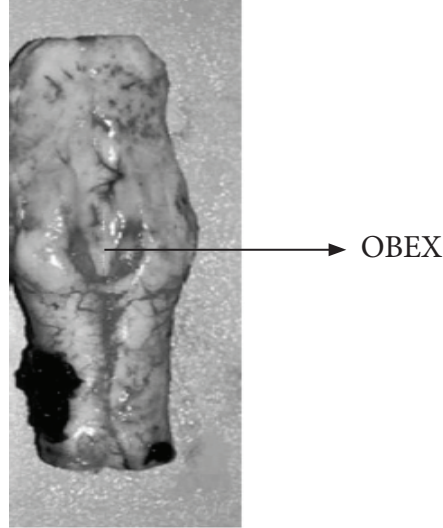
- ☐ İnkübatör
- ☐ Santrifüj (6500 rpm, 25 sn)
- ☐ Tek kanallı ve çok kanallı mikropipetler
- ☐ Otomatik pipet kontroller
- ☐ ELISA okuyucu
- ☐ Disposable pipetler
- ☐ Steril santrifüj tüpü

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

- ☐ ELISA Test Kiti
- ☐ Stop Solüsyonu olarak 0.5-1.0 N HCl veya 1.0 N H₂SO₄
- ☐ Sodyum hypochlorite (Çamaşır suyu)
- ☐ Deiyonize su

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması:

- ☐ BSE teşhisi amacıyla gönderilen beyin kökü örnekleri kit aparatı ile alınır.



- ☐ 0.30 gr (±0.05 gr) olarak alınan beyin, lenf dokusu veya dalak örneği, 2 kez 6500 rpm de 25 sn. santrifüj edilir.
- ☐ Elde edilen homojenatlar uygun sulandırma oranlarında sulandırılır.
- ☐ Antijen capture-platelere konularak inkübasyona bırakılır.
- ☐ Yıkama
- ☐ Conditioning buffer

- ☐ Yıkama
- ☐ Konjugat
- ☐ Yıkama
- ☐ Substrat
- ☐ Stop solusyonu
- ☐ ELISA okuyucuda okutma

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi:

Sonuçlar ELISA okuyucu ile ölçülerek antijen varlığı yönünden değerlendirilir. Kullanılan kit protokolüne göre sonuçlar değerlendirildikten sonra negatif/ pozitif şeklinde rapor edilir.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- ☐ OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.06_BSE.pdf http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.13_SCRAPIE.pdf
- ☐ Maxie, M.G., Youssef, S. (2007) Nervous System. In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Maxie, M.G. (ed), 1st ed., Elsevier Saunders, Edinburg, London, Newyork, Toronto, London, Sydney, Vol:1, p. 390-391.
- ☐ Türkiye'de kullanım için izin veya ithal ruhsatı alınmış kitler.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KAMFİLOBAKTERİOZİS (CAMPHYLOBACTERIOSIS)'İN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Ruminantlarda (özellikle sığır ve koyunlarda) ağırlıklı olarak genital sistemde etkili olan, gebe hayvanlarda abort yapan Kamfilobakteriozis'in yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir. Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities" bölümü ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY \(bis\).pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_bis.pdf)) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HE: Hematoksilen-Eosin.

Kamfilobakteriozis (Camphylobacteriosis): Sığırlarda *Camphylobacter fetus* spp. venerealis (C. fetus spp venerealis)'in oluşturduğu primer venereal bir hastalık olup, koitusla veya suni tohumlama sırasında geçer. Hastalık uzun süren östrus ile tekrarlayan kanamalar ve geçici infertilite ile karakterizedir. Sığırlarda Kamfilobakteriozis'in önemi, çok belirgin abortus yapmasından ziyade, geçici infertilite oluşturmasıdır. Abortus her zaman olabilir, fakat genellikle gebeliğin 4-6. aylarında olur ve plasenta retensiyonu şekillenir. Atılan fötüs ve plasenta, genellikle otolizedir. Bu da yavrunun atılmadan önce öldüğünü gösterir. Plasenta lezyonları spesifik değildir ve genellikle brucellosis lezyonlarına benzer, fakat daha hafiftir. Kotiledonlar arası plasenta ödemlidir, opak görünüşte ve deri gibi olabilir.

Koyunlarda *C. fetus* spp. *intestinalis* etkindir. Etken, koyunların bağırsak kanalının primer patojenidir ancak bakteriyemi sırasında hematojen olarak gebe uterusu da yayılabilir. Koyunlarda temel bulgu geç abortus, premature doğum ve zayıf kuzu doğumlarıdır. Fötal membranların retensiyonu her zaman görülmez. Bazen metritis sonucu fötal ölümler olabilir. Kotiledonlar büyük, solgun sarı renkte, yumuşak kıvamda, donuk, pelte gibidir ve üzeri kahve renkli eksudat ile örtülüdür. Birçok abortusta, sığırlarda olduğu gibi, atılan fötüste ödematöz değişikliklerden başka bir şey görülmez. Bazılarında vücut boşluklarında fazla miktarda sıvı toplanabilir. Bazılarında ise purulent pnömoni ile karaciğerde 1-2 cm büyüklüğünde, bazen daha küçük, değişen sayılarda

fokal purulent ve nekrotik odaklar görülür.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Ruminantlarda Kamfilobakteriozis'in yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için gerekli mikroskopik bulguları açıklamaktır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

Uterus, plasenta, fötüse ait dokular, lenf düğümü ve testis gibi organ örnekleri, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir. Tespit edilen örnekler, daha sonra rutin doku işleme yöntemlerine göre işlenir ve hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, Hematoksilen-Eosin (HE) boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda muayene edilir.

7.1. Materyal

Uterus, plasenta, fötüse ait dokular, lenf düğümü gibi organ örnekleri incelenir.

7.1.1 Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Su Banyosu

Etüv

Boyama seti

Boyama Cihazı

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

%37-40 formaldehid

Sodyum fosfat monobasic

Sodyum fosfat dibasik (anhidröz)

Dereceli alkoller (60°, 70°, 80°, 96°)

Absolut alkol 100°

Ksilol

Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)

Hazır Hematoksilen-eosin boyası

Lityum karbonat

Hidroklorik asid

Entellan

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonu

%37-40 formalin	100.0 ml
Distile su	900.0 ml
Sodyum fosfat monobasic	4.0 g

Sodyum fosfat dibasik (anhidroz)	6.5 g
<u>Doymuş Lityum karbonat</u>	
Lityum karbonat	1.0 g
Distile su	100.0 ml
<u>Asit alkol</u>	
Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asid, konsantre	10.0 ml

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1.Dokuların Tespiti:

Doku örnekleri, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir.

7.2.2.Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- Tespit edilen dokular, trimlenerek kasetlere yerleştirilir.
- Çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- Dokular, Doku Takip Cihazı'nda dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir; daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 60 ⁰	(120 dakika)
Etanol 70 ⁰	(120 dakika)
Etanol 80 ⁰	(120 dakika)
Etanol 96 ⁰	(120 dakika)
Etanol 96 ⁰	(120 dakika)
Absolut etanol 100 ⁰	(120 dakika)
Absolut etanol 100 ⁰	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol – Parafin	(120 dakika)
Parafin	(120 dakika)

- En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3.Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56⁰-60⁰'lik etüvde kurutulur.

7.2.4.Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile Kapatılması:

Daha sonra kesitler Hematoksilen-Eosin ile boyanarak üzerlerine lamel kapatılır.

Hematoksilen-Eosin Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, önce 3 adet ksilol kaplarında her birinde 5 dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. İki adet absolut alkol kaplarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol

uzaklaştırılır ve sırasıyla dereceli alkollerden (96⁰, 80⁰, 70⁰) geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.

2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Instant hematoksilen (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 4 dakika boyanır.
4. Çeşme suyunda yıkanır.
5. Asit alkolde dekolore edilerek boyanın fazlası alınır.
6. Çeşme suyunda yıkanır.
7. Lityum karbonatlı suda 5 dakika bekletilir.
8. Alkolik Eosin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 1 dakika boyanır.
9. 70⁰'den başlayarak her birinde 2'şer dakika olmak üzere 80⁰ ve 96⁰'lık alkollerden ve absolut alkollerden geçirilerek eosinin fazlası alınır.
10. Ksilol kaplarında 2'şer dakika tutularak alkolden arındırılır ve şeffaflandırılır.
11. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi:

Hematoksilen-Eosin ile boyanan doku kesitlerinde; sığırlarda erken embriyonal ölümlerle sonuçlanan olgularda; endometriyal lezyonlar hafif, fokal ve diffuz lenfositik endometritis şeklindedir. Bezlerde de kistik genişlemeler görülür. Plasenta lezyonları spesifik değildir ve genellikle Brucellosis lezyonlarına benzer, fakat daha hafiftir. Kotiledonlar arası plasenta ödemlidir, opak görünüşte ve deri gibi olabilir. Burada diffuz hücre infiltrasyonu bulunur ve bunların çoğunluğunu makrofajlar oluşturur. Plasentitisin derecesi oldukça değişiktir. Bazen belirgin olmayabilir. Fötüsteki lezyonlar spesifik değildir. Genellikle vücut boşlukları ve subkutiste kanla boyalı effüzyon vardır. Bunun yanında diffuz purulent pnömoni ile fokal purulent, nekrotik hepatitis görülür.

Koyunlarda nekroz, çevrede başlıca makrofaj ve bol lökosit infiltrasyonu görülür. Sekonder olarak bronkopneumoni vardır. Ayrıca böbrek korteksinde hemorajiler görülür. Korionik stroma ödemli, makrofaj ve lökosit infiltrasyonu vardır. Vaskulitis bulunur. Hafif endometritis vardır. Karunkuler septumlarda belirgin yangısal reaksiyon bulunur.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- ☐ OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.05_BGC.pdf
- ☐ Schlafer, D.H., Miller, R.B. (2007) Female Genital System, In : Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Maxie, M.G. (ed), 5th ed., Elsevier Saunders, Edinburg, London, Newyork, Toronto, London, Sydney, Vol:3, p. 489-491.
- ☐ Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd ed., McGraw-Hill Book Company, Newyork, Toronto, London, Sydney, p. 38-39.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

LEPTOSPIROZİS (LEPTOSPIROSIS)'İN HİSTOPATOLOJİK TESPİTİ

1. AMAÇ

Histolojik doku kesitlerinde hem morfolojik lezyonların hem de *Leptospira spp.*'nin (Levaditi Gümüş Boyama Metodu aracılığıyla) varlığının ortaya konmasıdır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir. Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities” bölümü ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_\(bis\).pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_(bis).pdf)) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HE: Hematoksilen-Eosin.

Leptospiroz (Leptospirosis): Kemiriciler, insanlar ve evcil hayvanlarda *Leptospira interrogans* serovarlarının yol açtığı spiroketal bir enfeksiyondur. Sığırlarda en önemli serovarlar *Leptospira hardjove* *Leptospira pomona* tipleridir. Çiftlik hayvanlarında özellikle abortusların ve ölü doğumların önemli bir nedenidir. Ancak hayvanlarda yol açtığı akut hastalıktan (septisemi, hepatitis, nefritis, meningitis) ölümlere de yaygın şekilde rastlanır.

Patojenik leptospiraların doğal rezervuarı böbreklerin proksimal konvolut tubulusları ve bazı doğal konakçılarda genital kanaldır. Doğal konakçılarda bulaşma direkt olarak idrar, abortus sonrası akıntılar, venereal yol ve sütle; konjenital olarak da hastalıklı hayvanlarda transplasental yolla olur. Subklinik enfeksiyonlarda ve hastalığı geçirmiş hayvanlarda mikroorganizmalar idrarla uzun süre dışarı atılır ve böylece bu gibi hayvanlar enfeksiyonu diğer hayvanlara bulaştırır. Etkenler mukozadan ve suda yumuşamış deriden vücuda girer ve lokal bir lezyona yol açmadan vücutta yayılır. En çok 7 gün süren bu leptospiremik devrede özellikle karaciğer, böbrekler, akciğer, plasenta, meme bezleri ve serebrospinal sıvıda etkene rastlanır.

Akut leptospirozisin en şiddetli formuna özellikle *Leptospira pomona* serovarı ile enfekte buzağılarda rastlanır; ancak bu hastalık formu yaygın değildir. Hemoglobiniüri ilk gözlenen bulgudur. Ölümle sonuçlanan olgularda, idrar kırmızı şarap rengine olur. Böbrek tubuluslarına kanamalar sonu hematüri gelişir ve idrar yollarında kan pıhtıları bulunur. Hastalıkta ateş, anemi, ikterus, akciğer konjesyonuna bağlı solunum güçlüğü şekillenir. Abortus akut devrede görülebilir ya da iyileşme dönemi sırasında haftalarca sonra şekillenebilir.

Hastalığın en yaygın formu süt ineklerinde gözlenen ve pek şiddetli olmayan subakut leptospirozisidir. Süt üretimi oldukça azalır ve geçici ateş vardır. Meme başından süütün damla damla gelmesi nedeniyle “süt damla sendromu” ya da “gevşek meme mastitis formu” olarak tanımlanan

bu tabloda süt kolostrum kıvamında olup kalın pıhtılar içerir ve sarı renktedir; meme dokusu gevşek bir yapıdadır.

Hastalığın kronik formuna çoğunlukla *Leptospira hardjo* ve *Leptospira pomona* neden olmaktadır; gebe ineklerde fetal enfeksiyon şeklinde gelişen hastalık abortus, ölü doğum ve prematür ya da enfekte buzağı doğumu ile karakterize olur. Abortus ve ölü doğum çoğunlukla hastalığın tek bulgusudur.

Akut leptospirozisten ölen sığırların nekropsilerinde hafif sarılık ve şiddetli anemi göze çarpar. Kanamalar bulunmayabilir ya da serozalarda ve subkutiste çok sayıda ekimoza rastlanır. Akciğer solgun renkte ve ödemli olur. Karaciğer büyük, yumuşak kıvamlı ve anemik olur. Vena sentralis'ler çevresinde nekroz odaklarına rastlanır. Böbrekler şişkindir ve koyu renktedir, beyazımsı-sarı renkli odaklara rastlanır.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Leptospirozis'in yaklaşımsal histolojik teşhisi için lezyonlu karaciğer ve böbrek kesitlerinde gümüş boyama metodu kullanılarak spiroket etkenleri ile bilhassa karaciğer ve böbreklerde oluşan lezyonların gösterilmesidir.

7. TEST METODUNUN TANIMI

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilen hastalıktan şüpheli karaciğer ve böbrek örnekleri, Levaditi-Monavelian gümüş boyama metodu prosedürüne göre işlenerek parafin bloklar hazırlanır. Bu bloklardan alınan kesitler ışık mikroskobunda incelenir. Gümüş boyanan karaciğer ve böbrek kesitlerinde; karaciğerde hepatositlerde ve böbreklerde tubul epitelleri ile lumenlerinde gümüş ile siyah renge boyanan spiroketal etkenler aranır.

7.1. Materyal

Karaciğer ve böbrek örnekleri incelenir.

7.1.1 Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Su Banyosu

Etüv

Boyama seti/ Boyama Cihazı

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

%37-40 formaldehid

Sodyum fosfat monobazik

Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)

Dereceli alkoller (60°, 70°, 80°, 96°)

Absolut alkol 100°

Ksilol

Parafin

Hazır Hematoksilen-eosin boyası

Lityum karbonat

Hidroklorik asit

Gümüş nitrat solüsyonu

İndirgeme solüsyonu

Entellan

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonu

%37-40 formalin 100.0 ml

Distile su 900.0 ml

Sodyum fosfat monobazik 4.0 g

Sodyum fosfat dibasik (anhidroz) 6.5 g

Doymuş Lityum karbonat

Lityum karbonat 1.0 g

Distile su 100.0 ml

Asit alkol

Alkol %70 1000.0 ml

Hidroklorik asit, konsantre 10.0 ml

%3 Gümüş nitrat solüsyonu

Gümüş nitrat 3.0 g

Distile su 100.0 ml

İndirgeme solüsyonu

Pyrogallik asit 4.0 g

Formalin %37-40 5.0 ml

Distile su 100.0 ml

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1. Dokuların Tespiti:

Karaciğer ve böbrek örnekleri, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir.

7.2.2. Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- Tespit edilen dokular, trimlenerek kasetlere yerleştirilir.
- Çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- Dokular, Doku Takip Cihazı'nda dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir; daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 60° (120 dakika)

Etanol 70° (120 dakika)

Etanol 80° (120 dakika)

Etanol 96° (120 dakika)

Etanol 96° (120 dakika)

Absolut etanol 100° (120 dakika)

Absolut etanol 100° (120 dakika)

Ksilol (120 dakika)

Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol – Parafin	(120 dakika)
Parafin	(120 dakika)

- En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

Levaditi-Manovelian Gümüş Boyama Metodu

1. Formol tespitini takiben 2 mm. inceliğinde trimlenen doku örnekleri, çeşme suyunda 1-3 saat süreyle yıkanır.
2. 24 saat süreyle % 96'lık alkolde tutulur.
3. Doku, kabın dibine çökünceye kadar distile suda tutulur.
4. Taze hazırlanmış gümüş nitrat solüsyonu içine konur ve karanlıkta 37°C'de 3-5 gün solüsyon yenilenerek bekletilir.
5. Distile suda çalkalanır.
6. Karanlıkta oda sıcaklığında, 1-3 gün indirgeme solüsyonunda bekletilir.
7. Distile suda çalkalanır.
8. %80, %96'lık alkol ve absolut alkollerden her birinde 30 dakika ve 2 ksilol kabında 1'er saat tutularak geçirilir ve 2 parafin kabında 45'er dakika bekletilir.
9. Parafine gömülür.
10. 5 µm kalınlığında alınan doku kesitleri, ksilollerden geçirilerek üzerlerine lamel yapıştırılır.

7.2.3.Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56°-60°'lik etüvde kurutulur.

7.2.4.Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile Kapatılması:

Daha sonra kesitler HE ile boyanarak üzerlerine lamel kapatılır.

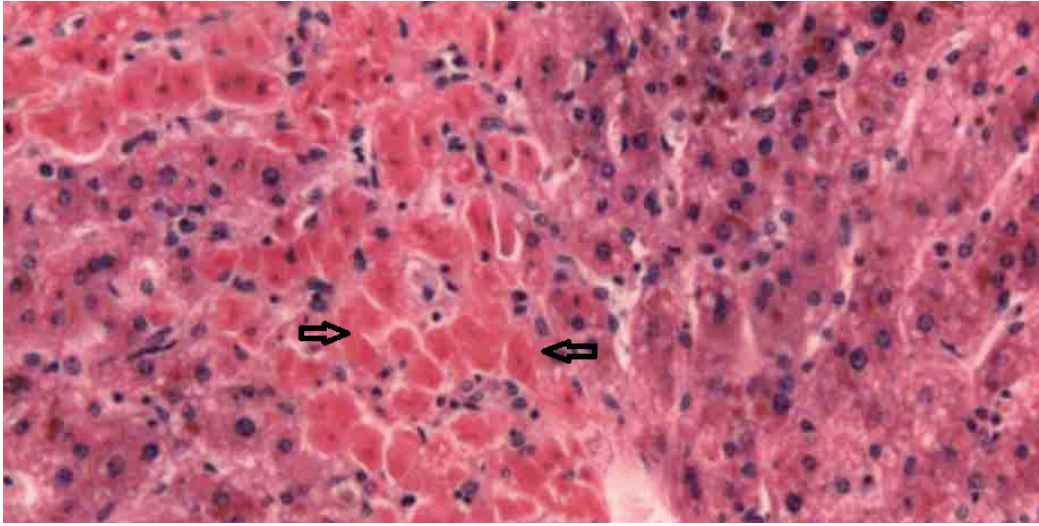
Hematoksilen-Eosin Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, önce 3 adet ksilol kaplarında her birinde 5 dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. 2 adet absolut alkol kaplarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol uzaklaştırılır ve sırasıyla dereceli alkollerden (96°, 80°, 70°) geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.
2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Instant hematoksin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 4 dakika boyanır.
4. Çeşme suyunda yıkanır.
5. Asit alkolde dekolore edilerek boyanın fazlası alınır.
6. Çeşme suyunda yıkanır.
7. Lityum karbonatlı suda 5 dakika bekletilir.
8. Alkolik Eosin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 1 dakika boyanır.
9. 70°'den başlayarak her birinde 2'şer dakika olmak üzere 80° ve 96°'lik alkollerden ve absolut alkollerden geçirilerek eosinin fazlası alınır.
10. Ksilol kaplarında 2'şer dakika tutularak alkolden arındırılır ve şeffaflandırılır.
11. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

Hematoksilen-Eosin ile boyanan doku kesitlerinde; sığır leptospirozis'inde karaciğerde çoğunlukla periasiner nekroz görülür (Resim 1). Ölümle sonuçlanan akut olgularda böbrekte kortikal tubulus epitellerinde şiddetli dejeneratif ve nekrotik değişiklikler vardır. Böbrek tubuluslarında safra renkli maddelere bağlı pigmentleşme belirgindir. Böbreklerde intersitisyel dokuda ödem ile plazma hücresi ve lenfosit infiltrasyonu görülür.

Gümüş boyanan doku kesitlerinde; sarı zeminde siyah renkte spiroketal etkenlerin görülmesi müspet olarak değerlendirilir.



Resim 1. Periasiner nekroz, Leptospirozis, Karaciğer, HE, x100 (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Arşivi).

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.09_LEPTO.pdf
- Brown, C.C., Baker, D.C., Barker, I.K. (2007) Alimentary System, In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Maxie, M.G. (ed), 5th ed., Elsevier Saunders, Edinburg, London, Newyork, Toronto, London, Sydney, Vol:2, p. 481, 484-486, 493-496.
- Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd ed., McGraw-Hill Book Company, Newyork, Toronto, London, Sydney, p. 238-239.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

LİSTERİOZİS (LISTERİOSIS)'İN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Ruminantlarda (özellikle sığır, koyun ve keçilerde) encephalitis, septicemi ve abortus gibi klinik sendromlar ile ortaya çıkan ve zoonoz olan Listeriozis'in yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir. Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities" bölümü ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_\(bis\).pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_(bis).pdf)) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HE: Hematoksilen-Eosin.

Listeriozis (Listeriosis): Etken *Listeria monocytogenes*'tir. Tavşan ve kobaylarda subletal dozları monositozise neden olduğundan "*monocytogenese*" adı verilmiştir.

Hastalık çoğunlukla kışın ve ilkbahar başlangıcında görülür. Stres faktörleri organizma ile bakteri arasındaki dengeyi bakteri lehine bozar ve bakteremi gelişir.

Serebral Listeriozis'in konsantre silaj yemlemesiyle ilişkisi olduğu sanılmaktadır. Silajla bu ilgi, hayvanlarda sonradan bir duyarlılığın oluşması ya da silajın organizmanın gelişmesi için uygun ortam oluşturduğu şeklindedir. Etken pH 5.5 ve üzerinde iyi fermente edilmemiş silajlarda çoğalır.

Listeriozis aslında üç ayrı hastalık ya da sendrom gibi davranır. Bunlar gebe uterusun enfeksiyonu ve abortus, milier visceral apselerle karakterize septicemi ve encephalitistir. Etken özellikle konjunktiva, idrar kesesi ve bağırsak epitellerinde çoğalır, hücreleri yıkımlar ve serbest kalan etkenler makrofajlar tarafından fagosite edilir. Makrofajların taşınması bazı olaylarda septicemiye neden olur. Hastalığın septicemik formu visceral, özellikle karaciğerde apselerle karakterize olup geviş getirenlerde ve özellikle yeni doğanlarda görülür.

Abortus gebeliğin geç dönemlerinde şekillenir, anneler her zaman hastalığa yakalanmazlar. Serebral Listeriozis'te ise etkenin caudex cerebri'ye affinitesi vardır ve şiddetli lezyonlar medulla oblongata ve ponstadır. Listeriozis'in çeşitli geviş getirenlerdeki sinirsel belirtileri; mental şaşkınlık, depresyon, başın bir yere dayandırılması ya da bir veya birkaç medüller merkezin felci şeklindedir. Karak-

teristik olarak baş yana doğru bükülmüştür, böyle bir hayvan yürütüldüğünde dairesel hareket yapar. Yedinci sinirin felci sonu kulak, göz kapağı ve dudak sarkar. Çiğneme kasları ve farinkste felç şekillenebilir.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Ruminantlarda Listeriozis'in yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için gerekli mikroskopik bulguları açıklamaktır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

Hastalığın encephalitis formundan şüpheli vakalarda medulla ve pons gibi beyin stemi bölgeleri, yeni doğanlarda görülen septisemik formunda karaciğer, böbrek, dalak ve kalp gibi organ örnekleri, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir. Tespit edilen örnekler, daha sonra rutin doku işleme yöntemlerine göre işlenir ve hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, Hematoksilen-Eosin (HE) boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda muayene edilir. Histolojik doku kesitlerinde; hastalığın encephalitis formunda beyin steminde genellikle beynin bir yanını daha şiddetli olarak etkileyen mikroapselerden ve perivasküler hücre infiltrasyonları ile ilişkili yangısal hücre odaklarından oluşan nonpurulent/purulent meningoencephalitis lezyonları, septisemik formda ise milier apseler aranır.

7.1. Materyal

Encephalitis formunda medulla ve pons gibi beyin stemi bölgeleri; septisemik formda karaciğer, böbrek, dalak ve kalp gibi organ örnekleri incelenir.

7.1.1 Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Su Banyosu

Etüv

Boyama seti

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

%37-40 formaldehid

Sodyum fosfat monobazik

Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)

Dereceli alkoller (60°, 70°, 80°, 96°)

Absolut alkol 100°

Ksilol

Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)

Hazır Hematoksilen-eosin boyası

Lityum karbonat

Hidroklorik asid
Entellan

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonu

%37-40 formalin	100.0 ml
Distile su	900.0 ml
Sodyum fosfat monobasic	4.0 g
Sodyum fosfat dibasik (anhidröz)	6.5 g

Doymuş Lityum karbonat

Lityum karbonat	1.0 g
Distile su	100.0 ml

Asit alkol

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asid, konsantre	10.0 ml

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1.Dokuların Tespiti:

Doku örnekleri, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir.

7.2.2.Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- Tespit edilen dokular, trimlenerek kasetlere yerleştirilir.
- Çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- Dokular, Doku Takip Cihazı'nda dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir; daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 60 ⁰	(120 dakika)
Etanol 70 ⁰	(120 dakika)
Etanol 80 ⁰	(120 dakika)
Etanol 96 ⁰	(120 dakika)
Etanol 96 ⁰	(120 dakika)
Absolut etanol 100 ⁰	(120 dakika)
Absolut etanol 100 ⁰	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol – Parafin	(120 dakika)
Parafin	(120 dakika)

- En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3.Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56⁰-60⁰'lik etüvde kurutulur.

7.2.4.Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile Kapatılması:

Daha sonra kesitler Hematoksilen-Eosin ile boyanarak üzerlerine lamel kapatılır.

Hematoksilen-Eosin Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, önce 3 adet ksilol kaplarında her birinde 5 dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. İki adet absolut alkol kaplarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol uzaklaştırılır ve sırasıyla dereceli alkollerden (96⁰, 80⁰, 70⁰) geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.
2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Instant hematoksilen (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 4 dakika boyanır.
4. Çeşme suyunda yıkanır.
5. Asit alkolde dekolore edilerek boyanın fazlası alınır.
6. Çeşme suyunda yıkanır.
7. Lityum karbonatlı suda 5 dakika bekletilir.
8. Alkolik Eosin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 1 dakika boyanır.
9. 70⁰'den başlayarak her birinde 2'şer dakika olmak üzere 80⁰ ve 96⁰'lik alkollerden ve absolut alkollerden geçirilerek eosinin fazlası alınır.
10. Ksilol kaplarında 2'şer dakika tutularak alkolden arındırılır ve şeffaflandırılır.
11. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi:

Histopatolojik değişiklikler; encephalitis formunda meningitis, mikroapse oluşumları, perivasküler hücre infiltrasyonları ve malasik lezyonlar ile karakterizedir.

Lezyon beyin parankiminde başlar ve meningitis sekonder olarak gelişir. Beyincik ve omuriliğin servikal kısmındaki meningitis daha az şiddetlidir. Tipik parankimal lezyon mikroapse şeklindedir. Apse nötrofil lökosit topluluğu şeklinde başlayabildiği gibi mikrogliyal reaksiyonun ortasında da gelişebilir ve bu fokal lezyonlar beyaz maddeye de yayılabilir. Glia nodüllerini ve fokal apseleri çevreleyen beyin parankimi ödemli ve seyrekleşmiştir. Bu alanlar nötrofiller ve hipertrofik mikrogliyal tarafından infiltre olabilir. Mikroapselere yakın beyaz maddede akut vaskülitis ile birlikte fibrin eksudasyonu vardır. Lenfosit, makrofaj ve daha az sayıda nötrofil ile eozinofil lökositlerden oluşan perivasküler hücre infiltrasyonları şiddetlidir.

Septisemik formda çoğunlukla karaciğerde nadiren de kalp ve diğer organlarda milier yayımlı apseler gözlenir.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.07_LISTERIA_MONO.pdf
- Schlafer, D.H., Miller, R.B. (2007) Female Genital System, In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Maxie, M.G. (ed), 5th ed., Elsevier Saunders, Edinburg, London, Newyork, Toronto, London, Sydney, Vol:3, p. 492-493.
- Maxie, M.G., Youssef, S. (2007) Nervous System, In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Maxie, M.G. (ed), 1st ed., Elsevier Saunders, Edinburg, London, Newyork, Toronto, London, Sydney, Vol:1, p. 405-408.
- Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forced Institute of Pathology, 3rd ed., McGraw-Hill Book Company, Newyork, Toronto, London, Sydney, p. 38-39.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

TOKSOPLAZMOZİS (TOXOPLASMOSIS)'İN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Toxoplasma gondii tarafından meydana getirilen Toksoplazmozis'in yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir. Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities" bölümü ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY \(bis\).pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_bis.pdf)) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

4. KISALTMALAR/TANIMLAR

HE: Hematoksilen-Eosin.

Toksoplazmoz (Toxoplasmosis): *Sarcocystidae* familyasında bulunan *Toxoplasma gondii*'nin oluşturduğu protozoer bir enfeksiyondur. Doğal enfeksiyonlara kanatlılarda, primatlarda, kemiricilerde, insektivorlarda, otçullarda, etçillerde ve insanlarda rastlanır. Son konakçı felideler olup kedilerde yaygın olarak bulunur. Kediler ayrıca arakonakçı da olurlar ve çeşitli organlarda bağırsak dışı formlar gelişir. İnsan da dahil birçok memeli hayvan arakonakçıdır. Arakonakçılarda *T. gondii*'nin gelişimi bağırsak dışı olup takizoit ve bradizoit oluşumuyla sonuçlanır.

Hastalığın bulaşmasında kedi ve yabani felidelerin dışkılarıyla oositlerin saçılması oldukça önemlidir. Transplasental enfeksiyonlara koyun ve keçilerde yaygın şekilde, domuz ve insanlarda da sporadik olarak rastlanır. Etçiller ve insanlar enfekte hayvanların dokularında bradizoit kapsayan kistleri sindirim yoluyla alarak enfekte olabilirler.

Toksoplazmozisde klinik bulgular etkilenen organa göre değişir. En sık rastlanan bulgular ateş, uyuşukluk, iştahsızlık, göz ve burun akıntısı ve solunum sistemi bozukluklarıdır. Sinirsel bulgular inkoordinasyon, dairesel şekilde dönme, titremeler, opistotonus, konvülziyonlar ve parezistir. Parezis ile birlikte sık sık radikülitis ve miyozitis vardır.

Evcil hayvanların çoğunda sistemik Toksoplazmozis görülür. Bu gibi olgularda interstisyel pnömoni, fokal karaciğer nekrozları, lenfadenitis, myokarditis ve nonsuppuratif meningoensefalitis şekillenir. En sık bulunanlar akciğer lezyonları olup bunu santral sinir sistemi lezyonları izler. Farklı organlarda oluşan lezyonlar çoğu hayvan türünde morfolojik olarak birbirine benzer, yalnızca

şiddetinde değişiklik olur.

Akciğerdeki lezyonlar plöra yüzeylerinde düzensiz gri nekroz odaklarından hemorajik pnömoniye kadar değişir. Karaciğerde düzensiz ve küçük beneklenmeler şeklinde fokal nekrozlara ve safra kesesinde ödeme rastlanır. Lenf düğümleri ve dalak büyür. Plöra, periton ve perikard efüzyonları şekillenir. Kalp kasında ve iskelet kaslarında solgun odaklara rastlanır. Tüm organlarda akut hemorajik bir reaksiyon şekillenir.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Toksoplazmozise yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için gerekli mikroskopik bulguları açıklamaktır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

Abortus olgularında plasenta ve beyin dahil fetal iç organ örnekleri, akut toksoplazmozisden şüpheli olgularda da beyin ve iskelet kasları dahil karaciğer, kalp, akciğer gibi iç organ örnekleri, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir. Tespit edilen örnekler, daha sonra rutin doku işleme yöntemlerine göre işlenir ve hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, Hematoksilen-Eosin (HE) boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda muayene edilir. Histolojik doku kesitlerinde; akut toksoplazmozisde birçok dokularda fokal nekroz odakları ile fokal mononükleer yangı tablosunun, koyun ve keçilerdeki abortus olgularında plasental kotiledonlarda nonsuppuratif bir yangı ile eşlik edilebilen ve zamanla kireçlenme gösterebilen büyük koagülasyon nekrozu odaklarının ve fetal beyinde nonpurulent meningoensefalitis, fokal mikrogliosis ve fokal lökomalasi odaklarından ibaret lezyonların varlığı ile nekroz ve yangı sahalarında saptanabilen toksoplazmozis takizoitlerinin varlığı aranır.

7.1. Materyal

Abortus olgularında plasental kotiledonlar, beyin dahil fetal organlar, akut toksoplazmozisden şüpheli olgularda da beyin ve iskelet kasları dahil iç organ örnekleri incelenir.

7.1.1 Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Su Banyosu

Etüv

Boyama seti

Boyama Cihazı

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

%37-40 formaldehid

Sodyum fosfat monobasic

Sodyum fosfat dibasik (anhidroz)

Dereceli alkoller (60°, 70°, 80°, 96°)

Absolut alkol 100°

Ksilol

Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)

Hazır Hematoksilen-eosin boyası

Lityum karbonat

Hidroklorik asid

Entellan

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonu

%37-40 formalin	100.0 ml
Distile su	900.0 ml
Sodyum fosfat monobasic	4.0 g
Sodyum fosfat dibasik (anhidroz)	6.5 g

Doymuş Lityum karbonat

Lityum karbonat	1.0 g
Distile su	100.0 ml

Asit alkol

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asid, konsantre	10.0 ml

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1.Dokuların Tespiti:

Doku örnekleri, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir.

7.2.2.Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- Tespit edilen dokular, trimlenerek kasetlere yerleştirilir.
- Çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- Dokular, Doku Takip Cihazı'nda dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir; daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 60°	(120 dakika)
Etanol 70°	(120 dakika)
Etanol 80°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)

Ksilol	(120 dakika)
Ksilol – Parafin	(120 dakika)
Parafin	(120 dakika)

- En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3.Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56°-60°'lik etüvde kurutulur.

7.2.4.Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile Kapatılması:

Daha sonra kesitler Hematoksilen-Eosin ile boyanarak üzerlerine lamel kapatılır.

Hematoksilen-Eosin Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, önce 3 adet ksilol kaplarında her birinde 5 dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. İki adet absolut alkol kaplarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol uzaklaştırılır ve sırasıyla dereceli alkollerden (96°, 80°, 70°) geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.
2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Instant hematoksilin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 4 dakika boyanır.
4. Çeşme suyunda yıkanır.
5. Asit alkolde dekolore edilerek boyanın fazlası alınır.
6. Çeşme suyunda yıkanır.
7. Lityum karbonatlı suda 5 dakika bekletilir.
8. Alkolik Eosin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 1 dakika boyanır.
9. 70°'den başlayarak her birinde 2'şer dakika olmak üzere 80° ve 96°'lik alkollerden ve absolut alkollerden geçirilerek eosinin fazlası alınır.
10. Ksilol kaplarında 2'şer dakika tutularak alkolden arındırılır ve şeffaflandırılır.Üzerlerine lamel yapıştırılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi:

Histopatolojik muayenelerde; akciğerdeki erken lezyonlar diffuz intersitisyel pnömonidir. Alveol septumları mononükleer hücre infiltrasyonları, az sayıda nötrofil ve eozinofil lökosit infiltrasyonlarıyla kalınlaşır. Alveollerde fibrinli eksudat ve makrofajlar bulunur. Alveol septumlarında, bronşiol epitel hücrelerinde ve kan damarlarında nekroz odaklarına rastlanır. Bu lezyonların oluşumundan kısa bir süre sonra rejeneratif değişiklikler görülür. Alveollerde tip II pnömositlerde, hiperplazi ve hipertrofi şekillenir. Ayrıca alveol ve bronşiol epitel hücrelerinde, kan damarı duvarlarında da takizoitler/bradizoitler fark edilir.

Karaciğerde lobüller içinde düzensiz bir dağılım gösteren koagülasyon nekroz odakları bulunur. Nekrozlar çevresinde yangısal reaksiyon çok azdır ancak hepatositlerde ve Kupffer hücrelerinde takizoitlere rastlanır. Etkilenen organların lenf düğümlerinde de özellikle kortekste düzensiz nekroz odakları şekillenir. Nekrotik bölgelerin çevresinde orta şiddette yangısal reaksiyon, folliküllerde lenfositlerde nekroz ve gözden silinme vardır. Daha kronik olgularda, kortikal ve parakortikal

bölgelerdeki lenfoid hücrelerde nonspesifik hiperplazi ile medüller sinuslarda makrofaj birikimi görülür. Takizoitlere sinuslardaki fagositik hücrelerde rastlanabilir. Benzer lezyonlar dalakta da gözlenir. Nekrozlar daha çok kırmızı pulpadadır.

Kalp ve iskelet kaslarında nekroz odaklarına ve mononükleer hücre infiltrasyonlarına rastlanır. Zaman zaman myositlerdeki mitokondriyum kalsifikasyonu ile takizoitleri birbirinden ayırt etmek zor olur, ancak akut reaksiyonun çevre bölgelerinde sağlam tellerde bradizoit kistlere çoğunlukla rastlanır.

Beyinde nonsuppuratif meningoensefalitis ile multifokal nekroz ve sık sık malasi odakları şekillenir. Endotel hücrelerinde şişme, damar duvarında nekroz ve vaskulitis vardır. Belirgin perivasküler ödem ve peritel hücrelerinde hiperplazi görülür. Takizoitlere ve daha az olarak da bradizoit kistlerine damar duvarlarında ve nekrotik bölgelerde rastlanır. Omurilikte de beyinde görülenlere benzer lezyonlar şekillenir. Bir ya da daha çok organda pıhtılaşma nekroz odakları ile birlikte takizoitlerin ve/veya kistlerin görülmesi toksoplazmozisin tanısına yardımcı olur.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.10_TOXO.pdf
- Schlafer, D.H., Miller, R.B. (2007) Female Genital System, In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Maxie, MG (ed), 5th ed., Elsevier Saunders, Edinburg, London, Newyork, Toronto, London, Sydney, Vol:3, p. 513-514.
- Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forced Institute of Pathology, 3rd ed., McGraw-Hill Book Company, Newyork, Toronto, London, Sydney, p. 38-39.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

TRANSMISSIBLE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY (TSE)'LERİN İMMUNOPEROKSİDAZ BOYAMA METODU İLE TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Sığırlarda Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE), koyun ve keçilerde Scrapie ile kedilerde Feline Spongiform Encephalopathy (FSE) hastalıklarında beyin dokusunda prion proteinlerin varlığının tespiti amaçlanır.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, TSE'lerin konfirmasyonu amacıyla kullanılır ve Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir. Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities" bölümü (http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_bis.pdf) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Transmissible Spongiform Encephalopathy'ler için temel biyogüvenlik önlemleri daha önce (Sayfa 36, Tablo1) belirtilmiştir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

BSE: Bovine Spongiform Encephalopathy

FSE: Feline Spongiform Encephalopathy

IP: Immunoperoksidaz

PBS: Phosphate buffer saline

TSE: Transmissible Spongiform Encephalopathy

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

İndirekt IP boyama tekniği: Konjuge edilmemiş antikor ile dokudaki antijenin bağlanması temeline dayanır. Ortaya çıkan reaksiyonu tespit edilebilir hale getirmek için peroksidaz ile konjuge edilmiş sekonder antikor eklenir. Bu antikor primer antikora bağlanır. Daha sonra kullanılan kromojen antijen-antikor bağlantı bölgesinde renk oluşturur. Böylece antijen görünür hale gelir.

7. TEST METODUNUN TANIMI

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilen beyin stemi, rutin doku işleme yöntemlerine göre hazırlanarak parafinde bloklanır. Bu bloklardan alınan doku kesitleri, İndirekt IP tekniği ile boyanır ve ışık mikroskopunda muayene edilir. Histopatolojik bulguların şekillendiği bölgelerde; nöronlarda ve/veya nöropilde boyanma aranır.

7.1. Materyal

Histopatolojik muayeneler için formolde tespit edilmiş ve parafinde bloklanmış beyin stemi örneklerinden mikrotom ile alınmış kesitler kullanılır.

7.1.1. Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Etüv

Otoklav

Boyama seti/ Boyama Cihazı (HE ve IP)

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Dereceli alkoller (50°, 70°, 80°, 90°)

Absolut alkol

Ksilol

Hidrojen Peroksit

Formik Asit (%98-%100)

Sodyum Sitrat solusyonu

PBS

Mayer'in Hematoksileni

Su bazlı yapıştırıcı

Immunoperoksidaz boyama kiti

Target Retrieval Solüsyon

Proteinaz K

Monoklonal Antikor

Antikor sulandırıcı

Anti-Mouse IgG- Biotin

Streptavidin-HRP

AEC Substrat Kromojen

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması:

1. IP boyamalar için adeziv lam üzerine 5 mikron kalınlığında alınan doku kesitleri 48 saat 37°C'lik etüvde bekletilir.
2. Kesitler, 2 ksilolde 5'er dakika olmak üzere deparafinize edilir.
3. % 100 lük etanolde 3 dakika rehidrasyona bırakılır.
4. Endojen peroksit ile 30 dakika bloke edilir.

5. Sırasıyla % 90, % 80, % 70, % 50'lik etanolde rehidrasyon tamamlanır. Bu esnada kesitlerin kurumamasına özen gösterilir.
6. Doku kesitleri % 98-% 100'lük formik asitte 30 dakika bekletilir.
7. Distile suda dikkatlice yıkanır.
8. Sitrat solüsyonu (pH 6) içinde 134°C'lik sulu otoklavda 18 dakika bekletilir.
9. Soğumaya bırakılan kesitler sitrat solüsyonundan çıkarılarak yıkama solusyonu PBS ile yıkanır. Elde veya tam otomatik immunboyama cihazında;
10. Protein blocking (30 dakika)
11. Primer antikorda inkübasyon (60 dakika)
12. PBS ile yıkama (3 kez 2 dakika)
13. Polivalan Biotin ile işaretlenmiş sekonder antikor (30 dakika)
14. PBS ile yıkama (3 kez 2 dakika)
15. Streptavidin peroksidaz reagent (30 dakika)
16. PBS ile yıkama (3 kez 2 dakika)
17. Kromogen AEC (10 dakika)
18. PBS ile yıkama (3 kez 2 dakika)
19. Hematoksilen ile karşıt boyama yapılır.
20. Boyanması tamamlanmış doku kesitleri üzerine su bazlı yapıştırıcı damlatılarak lamel ile kapatılır.
21. Kesitler ışık mikroskobunda incelenir.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi:

Diagnostik histolojik bulguların şekillendiği bölgelerde; nöronlarda ve/veya nöropilde gözlenen kuvvetli derecede renklenmeye sahip granüler tarzda boyanmalar pozitif olarak kabul edilir.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- ☐ OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.
- ☐ Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd ed., McGraw-Hill Book Company, Newyork, Toronto, London, Sydney, p. 38-39.
- ☐ Frencik, M. (1993) Handbook of Immunocytochemistry.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

TRANSMISSIBLE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY (TSE)'LERİN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Sığırlarda Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE), koyun ve keçilerde Scrapie ile kedilerde Feline Spongiform Encephalopathy (FSE) hastalıklarının yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir. Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities” bölümü ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY \(bis\).pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_bis.pdf)) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Transmissible Spongiform Encephalopathy'ler için temel biyogüvenlik önlemleri daha önce (Sayfa 36, Tablo1) belirtilmiştir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

BSE: Bovine Spongiform Encephalopathy

FSE: Feline Spongiform Encephalopathy

TSE: Transmissible Spongiform Encephalopathy

HE: Hematoksilen-Eosin

Transmissible Spongiform Encephalopathy: Bu grup hastalıklarda koyunlarda scrapie, minklerde transmissible mink encephalopathy, geyiklerde kronik zayıflama hastalığı (Wasting disease), ceylanlarda spongiform benzeri encephalopathy, çita ve pumada spongiform encephalopathy, ineklerde spongiform encephalopathy (BSE), kedilerde spongiform encephalopathy (FSE) bulunur. Benzer spesifik ajanlar (prion, enfeksiyöz protein) tarafından oluşturuldukları kabul edilir. Prionlar, 20 nm boyutundadır. Nükleaz, proteinaz-K, kuru ısı, ultraviyole ışınları ve iyonize ışınlara dirençlidir.

Bovine Spongiform Encephalopathy (Mad Cow Disease): Hastalık etkeni tam olarak karakterize edilmemekle beraber prion olduğu ve enfeksiyöz etkenin de prion protein (PrP) olduğu kabul edilmektedir. Hastalık, ilk kez Kasım 1986'da İngiltere'de saptanmıştır ve daha çok süt ineklerinde dikkati çekmektedir. En fazla 4-5 yaşlı sığırlarda görülür. Dişiler erkeklere göre hastalığa daha çok tutulur.

Hastalığa, inkübasyon periyodunda (inkübasyon süresi 2-8 yıldır) bulunan hayvanların sürüye girmesi ya da hayvanlara et-kemik unu ve benzeri geviş getiren kökenli protein içeren yemlerin yedirilmesi yol açmaktadır.

Klinikte davranış, duruş ve yürüyüş anormallikleri vardır. En sık bulgu sinirlilik ya da değişen davranış ve mizaçtır. Hayvanlar genellikle ürkek ve tedirgindir. Omuz bölgesi, ventral servikal bölge ve arka bacakların üst kısımlarındaki kas gruplarında myoklonus şeklinde kontraksiyonlar görülür. Diş gıcirtısı, burun yalama, sese, dokunmaya ve ışığa karşı reaksiyon, sallantılı yürüyüş, yatma isteği ve kabarık yün örtüsü gözlenir. Sırtın tüm uzunluğu boyunca deri kaşındığında kuyruk ucunun kaldırılması ve dudak şapırdatma en sık görülen bulgudur. Scrapie' de rastlanan kaşıntı, BSE'de görülmez.

Makroskobik karakteristik bir lezyon yoktur. Mikroskobik olarak, beynin gri maddesinde iki taraflı simetrik dejeneratif değişiklikler gözlenir. Bu değişiklikler gri madde nöropilinde ve nöronlarda vakuolasyonla karakterizedir. Nöropilde belirgin sınırlı, ovoid ve küresel vakuoller ya da mikrokaviteler bulunur.

Feline Spongiform Encephalopathy: Evcil ve yabani kedi familyası üyelerini etkileyen ve prion tarafından meydana getirildiği kabul edilen nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalık ilk olarak 1990 yılında bildirilmiştir. Çoğu olgular İngiltere'de görülmüştür. BSE prionunun, kontamine sığır dokularının yenmesi ile kedilere bulaştırıldığı düşünülür. Inkübasyon periyodu, evcil kedilerde tam olarak belirlenmemiş olmakla birlikte hasta kedilerin en az 2 ve çoğunluğunun ortalama 4-9 yaşlı olduğu saptanmıştır.

İlk klinik bulgular, karakteristik olmayan sinirlilik, çekingenlik ve saklanma gibi davranış değişiklikleridir. Dışkılama bozuklukları ve ataksi görülür. Özellikle arka bacaklar etkilenir ve hasta kediler mesafe tayininde güçlük çekerler. Ses ve dokunmaya karşı hiperestezi vardır. Bazı kediler anormal baş sallama, titreme, boş bakma veya kendi etrafında dönme gösterebilir. Salivasyon artışı,

polifaji, polidipsi ve pupillalarda genişleme de bildirilmiştir. Ölüm, klinik bulguların ortaya çıkışını takiben 3-8 haftada şekillenir. Mikroskobik olarak, diğer TSE'lerde görüldüğü gibi nöropilde ve nöronlarda iki taraflı simetrik vakuoler değişiklikler gözlenir.

Scrapie (Koyunların chronic progressive spongiform Encephalopathy'si): Etiyolojisi üzerine çok sayıda görüş olmasına rağmen kabul gören prion teorisisidir. Genellikle 2-5 yaşlı koyunlarda görülür. Hastalığın inkübasyon periyodu aylar ve yıllar gibi çok uzun bir süredir.

Klinik olarak başlangıçta davranış, duruş ve yürüyüş bozuklukları dikkati çeker. Uyarıldıklarında titreme ve konvülziyonlar görülebilir. Bu ilk bulgular geçicidir. Koyunlar bel bölgesinden kaşındığında, başını yukarı doğru kaldırarak dudaklarıyla şiddetli kemirme hareketi yaparlar. Oluşan kaşınma arzunu ağzı ile ya da sabit duran cisimlere sürtünerek gidermeye çalışırlar. Tüy ve yünleri dökülür, çizik ve yaralar oluşur. Hayvanlarda dudak, baş ve vücutta tremorlar, huzursuzluk, ağırlık kaybı, inkoordinasyon, ataksi, yeme ve içmede zorluk gibi bulgular görülür. Sonuçta parezis ve paralizis şekillenir. İlk bulgulardan 4-7 ay sonra ölümler görülmeye başlar. Karakteristik makroskobik bir lezyon yoktur.

Mikroskobik lezyonlar oldukça spesifiktir. Lezyonlar klinik devrenin uzunluğuna bağlı olarak değişir. En belirgin bulgu nöron sitoplazmalarındaki 5-10 nm çaplı vakuollerdir. Vakuoller boyanabilir bir madde içermezler, çevreleri keskindir, birden fazla olabildikleri gibi eksantrik de yerleşebilirler. Nissl maddesini ve nörofibrilleri kenara iterler. Vakuollü nöronlarda başka bir dejenerasyon dikkati çekmez. Akson ve dentritleri sağlamdır. Bunlara tüm caudex cerebri ve omurilikte rastlanabilir.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

TSE'lerin yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için patodiagnostik olan mikroskobik bulguları açıklamaktır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilen beyin stemi, rutin doku işleme yöntemlerine göre işlenerek hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, Hematoksilen-Eosin (HE) boyası ile boyanır ve ışık mikroskobunda muayene edilir. Histolojik doku kesitlerinde; nöron ve nöropilde patodiagnostik özellikte olan vakuolasyon ile karakterize lezyonların varlığı aranır.

7.1. Materyal

Beyin stemi (Medulla-obex, Medulla-caudal cerebellar pedunculus ve orta beyin-rostral colliculus'ları ihtiva edecek şekilde 5 kesit) incelenir.

7.1.1 Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Su Banyosu

Etüv

Boyama seti/ Boyama Cihazı

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

%37-40 formaldehid

Sodyum fosfat monobazik

Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)

Dereceli alkoller (60°, 70°, 80°, 96°)

Absolut alkol

Ksilol

Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)

Hazır Hematoksilen-eosin boyası

Lityum karbonat

Hidroklorik asit

Entellan

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonu

%37-40 formalin	100.0 ml
Distile su	900.0 ml
Sodyum fosfat monobazik	4.0 g
Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)	6.5 g

Doymuş Lityum karbonat

Lityum karbonat	1.0 g
Distile su	100.0 ml

Asit alkol

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asit, konsantre	10.0 ml

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1.Dokuların Tespiti:

Beyin stemi, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir.

7.2.2.Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- Tespit edilen dokular, trimlenerek kasetlere yerleştirilir.
- Çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- Dokular, Doku Takip Cihazı'nda dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir; daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 60°	(120 dakika)
Etanol 70°	(120 dakika)
Etanol 80°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)

Etanol 96°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol – Parafin	(120 dakika)
Parafin	(120 dakika)

- En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3.Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56°-60°'lik etüvde kurutulur.

7.2.4.Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile Kapatılması:

Daha sonra kesitler Hematoksilen-Eosin ile boyanarak üzerlerine lamel kapatılır.

Hematoksilen-Eosin Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, önce ksilol kaplarında her birinde 5 dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. Absolut alkol kaplarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol uzaklaştırılır ve sırasıyla dereceli alkollerden (96°, 80°, 70°)geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.
2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Instant hematoksilen (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 4 dakika boyanır.
4. Çeşme suyunda yıkanır.
5. Asit alkolde dekolore edilerek boyanın fazlası alınır.
6. Çeşme suyunda yıkanır.
7. Lityum karbonatlı suda 5 dakika bekletilir.
8. Alkolik Eosin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 1 dakika boyanır.
9. 70°'den başlayarak her birinde 2'şer dakika olmak üzere 80° ve 96°'lik alkollerden ve absolut alkollerden geçirilerek eosinin fazlası alınır.
10. Ksilol kaplarında 2'şer dakika tutularak alkolden arındırılır ve şeffaflandırılır.
11. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi:

Hematoksilen-Eosin ile boyanan doku kesitlerinde; patodiagnostik bulguların şekillendiği medulla oblongatanın obeks bölgesinde nervus vagusun soliter tract ve dorsal motor nukleusları ile nervus trigeminusun spinal tract nukleusunda ve diğer beyin stemi bölgelerindeki nukleuslarda bilateral simetrik nöronal vakuolasyon (nöronal somada, akson ve dentritlerde) ve gri madde nöropilinde mikrokistik vakuolasyonların (spongiform değişiklikler) varlığı aranır. Nukleuslarda 3 ve üzeri bilateral simetrik spesifik vakuollerin varlığı TSE müspet olarak değerlendirilir.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.06_BSE.pdf http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.13_SCRAPIE.pdf
- Maxie, M.G., Youssef, S. (2007) Nervous System. In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Maxie, M.G. (ed), 1st edition, Elsevier Saunders, Edinburg, London, Newyork, Toronto, London, Sydney, Vol:1, p. 390-391.
- Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd ed., McGraw-Hill Book Company, Newyork, Toronto, London, Sydney, p. 38-39.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

Sığır Hastalıkları



SIĞIR TÜBERKÜLOZU (BOVINE TUBERCULOSIS)'NUN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Siğirlarda Tüberküloz'un yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir. Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities” bölümü ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY \(bis\).pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_bis.pdf)) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HE: Hematoksilen-Eosin

ZN: Ziehl-Neelsen

Siğir Tüberkülozu (Bovine Tuberculosis): Siğirlerin en önemli hastalıklarından biridir. Hastalığın insidansının yüksek olduğu bölgelerde hastalık tamamen *M.bovis* tarafından oluşturulur. Gebe ineklerde uterus en fazla tutulan organdır ve abortus ya da yeni doğan buzağılarda dissemine konjenital tüberkülozisle sonuçlanır.

Mycobacterium bovis’le enfeksiyon genellikle solunum ve sindirim yoluyla olur. Bakım faktörleri ve hastalığa yakalanılan yaş enfeksiyon yolu için başlıca belirleyicidir. Bundan başka deri, konjenital ve genital yollarla da bulaşma oluşabilir. Deri yoluyla enfeksiyon oldukça azdır. Konjenital tüberkülozis’te enfeksiyon umbilikal venayla fötusa geçer. Enfeksiyonun bu yolla yayılımı, hastalık siğirlarda olağan hale geldiğinde ve yeni doğan buzağılarda %0.5 oranına ulaştığında belli öneme sahip olur. Konjenital enfeksiyon daima uterus tüberkülozuna bağlı olarak şekillenir. Bu gibi olaylarda endometriumda küçük tüberküller bulunabilir. Tipik plasenta lezyonları, plasenta ile endometrium arasında kıvamlı bir eksudat ve kotiledonlardaki kazeonekrotik odaklardan oluşur. Buzağılarda konjenital enfeksiyonunda primer kompleks karaciğer ve portal lenf düğümlerindedir. Siğir enfeksiyonlarının çoğu 6 aylıktan büyük hayvanlarda gelişir. Erişkin siğirlarda görülen bu enfeksiyonlarda lezyon daha çok retrofaringeal, mediastinal ve bronşial lenf düğümlerinde yerleşir.

Erişkin sığırlarda primer enfeksiyon genellikle akciğerdedir ve damlacık enfeksiyonu ile oluşur. Lezyonlar produktif veya eksudatif tiptedir.

Akciğerde tüberkül oluşumu (produktif tip) bronşiol-alveol bölgesinde başlar ve alveollere doğru genişler. Başlangıçta sublobüler ya da lobüler yerleşimlidir. Histolojik yapısı tipik olarak tüberküldür. Bir lobta birden fazla odak bulunabilir ve loba yonca yaprağı görünüşü verir.

Birden fazla lobta da lezyon şekillenebilir. Akciğer lezyonlarının görünüşü sığır tüberkülozu için karakteristik olan sarımsı kazeifikasyon ve kalsifikasyon alanlarıdır. Akciğerdeki enfeksiyon organda bulunan tüberküloz lenf damarlarıyla yayılabilir, ancak esas yayılma başlıca hava yollarıyla olur. Bronkojenik yayılma bronşiyoller yoluyla direkt olabildiği gibi eksudatın aspirasyonu yoluyla da şekillenebilir.

Sığırlarda tüberkülozun bir özelliği seröz membranlara yayılma eğilimidir. Seröz membranlarda tüberkülozis primer lezyonun direkt olarak genişlemesiyle, akciğerlerden lenfojen yayılma, direkt hematojen yolla ya da komşu organdaki hematojen odağın lokal olarak genişlemesiyle gelişebilir. Plöra tüberkülozu büyük nodüller, diffuz kazeöz ya da intermedier tipte olabilir.

Enfeksiyonun generalizasyonu (diğer organlara diseminasyon) hastalığın başlangıcında (post primer generalizasyon, erken generalizasyon) ya da daha geç olarak (geç generalizasyon) görülebilir. Geç generalizasyon ilk enfeksiyon süresinde hayvanın kazanmış olduğu direncin bazı koşullar altında kırılmasıyla gelişir. Böylece basil bütün vücuda yayılır. Çok sayıda basil kan dolaşımına (milier tüberkülozis) girdiğinde generalizasyon birdenbire ve şiddetli oluşabilir ya da dolaşıma giren az sayıdaki basille daha geç olabilir. Akciğer tüberkülozunda basilin kan dolaşımına girmesi genellikle kazeifikasyon alanındaki küçük venaların yıkımıyla ya da lenf damarları yoluyla lenf düğümlerine oradan da vena kava'ya ulaşma şeklinde olur.

Akciğerlerde milier lezyonlar şekillendiğinde hastalık öldürücüdür. Lezyonlar başlangıçta tipik olarak şeffaf küçük gri tüberküller şeklindedir, ancak kısa süre sonra kazeöz hale gelir ve merkezleri kalsifiye olur.

Periton tüberkülozu, plöra tüberkülozuna oranla daha az görülür. Çeşitli yollarla gelişir. Karaciğeri örten periton tüberkülozu daha çok konjenital enfeksiyonu izler ve portal lenf düğümünde bulunan lezyonun lokal ve lenfatik yayılımı sonu şekillenir.

Karaciğer tüberkülozu hematojen kökenlidir. Enfeksiyon umbilikal venalarla karaciğere gelir. Konjenital enfeksiyonlarda basiller hematojen yayılımının bir kolu olan arteriyel kanla ya da bağırsakta lezyonlar bulunduğu portal venalar aracılığıyla karaciğere ulaşır. Karaciğerdeki tüberküloz odakları milierdir.

Böbrek tüberkülozu yapı ve tip bakımından karaciğer tüberkülozuna benzer. Milier lezyonlar kortekste sınırlı olup tüberküller interstisyel dokuda gelişmeye başlar.

Tüberküloz hastalığının eksudatif tipinde ise lezyon genellikle akut olarak gelişir. Eksudat çok bol olup fibrin, nötrofil ve mononükleer hücreleri içerir. Sonuçta eksudat pıhtılaşır ve kazeifikasyona uğrar.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Sığırlarda Tüberküloz hastalığının yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için gerekli mikroskopik bulguları açıklamaktır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

Lezyon gözlenen lenf düğümleri (özellikle baş ve göğüs lenf düğümleri), akciğer, bağırsak, karaciğer, dalak, böbrek, plöra ve periton örnekleri, %10 nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir. Daha sonra rutin doku işleme yöntemlerine göre işlenerek hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, patognomonik Tüberküloz lezyonları yönünden Hematoksilen-Eosin (HE) ve aside dirençli bakteriler yönünden Ziehl-Neelsen (ZN) boyama metodları ile boyanarak ışık mikroskopunda muayene edilir. Histolojik doku kesitlerinde; tüberküloz için patodiagnostik olan produktif tüberkül yapıları ya da eksudatif lezyonlar ile karakteristik histopatolojik bulguların varlığı aranır.

7.1. Materyal

Nekropside makroskopik olarak lezyon gözlenen lenf düğümleri (özellikle baş ve göğüs lenf düğümleri), akciğer, bağırsak, karaciğer, dalak, böbrek, plöra ve periton örnekleri incelenir.

7.1.1 Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Etüv

Boyama seti /Boyama cihazı

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

%37-40 formalin

Sodyum fosfat monobazik

Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)

Dereceli alkoller (60°, 70°, 80°, 96°)

Absolut alkol

Ksilol

Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)

Hazır Hematoksilen-eosin boyası

Lityum karbonat

Hidroklorik asid

Entellan

Fenol kristal

Basik fuksin

Sülfürik asit

Metilen mavisi

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonu

%37-40 formalin	100.0 ml
Distile su	900.0 ml
Sodyum fosfat monobazik	4.0 g
Sodyum fosfat dibasik (anhidroz)	6.5 g

Doymuş Lityum karbonat

Lityum karbonat	1.0 g
Distile su	100.0 ml

%1 Asit alkol solüsyonu

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asit, konsantre	10.0 ml

Carbol fuksin solüsyonu

Fenol kristal (çözölmüş)	2.5 ml.
Alkol, %100	5.0 ml.
Basık fuksin	0.5 gr.
Distile su	50.0 ml.
Kullanımdan önce filtre edilir.	

%1 Sülfürük asit solüsyonu

Sülfürük asit, konsantre	1.0 ml
Distile su	100.0 ml

Metilen mavisi solüsyonu (stok)

Metilen mavisi	1.4 g
Alkol, %96	100.0 ml

Metilen mavisi solüsyonu (çalışma)

Metilen mavisi solüsyonu (stok)	10.0 ml
Çeşme suyu	90.0 ml

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1. Dokuların Tespiti:

Lezyonlu doku örnekleri, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir.

7.2.2. Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- Tespit edilen dokular, trimlenerek kasetlere yerleştirilir.
- Çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- Dokular, Doku Takip Cihazı'nda dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir; daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 60⁰ (120 dakika)

Etanol 70⁰ (120 dakika)

Etanol 80⁰ (120 dakika)

Etanol 96⁰ (120 dakika)

Etanol 96⁰ (120 dakika)

Absolut etanol 100⁰ (120 dakika)

Absolut etanol 100⁰ (120 dakika)

Ksilol (120 dakika)

Ksilol (120 dakika)

Ksilol (120 dakika)

Ksilol – Parafin (120 dakika)

Parafin (120 dakika)

- En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3.Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56⁰-60⁰'lik etüvde kurutulur.

7.2.4. Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile Kapatılması:

Daha sonra kesitler HE ve ZN boyama tekniği ile boyanarak üzerlerine lamel kapatılır.

Hematoksilen-Eosin Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, önce ksilol kaplarında her birinde 5' er dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. Absolut alkol kaplarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol uzaklaştırılır ve sırasıyla dereceli alkollerden (96⁰, 80⁰, 70⁰) geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.
2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Instant hematoksilin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 4 dakika boyanır.
4. Çeşme suyunda yıkanır.
5. Asit alkolde dekolore edilerek boyanın fazlası alınır.
6. Çeşme suyunda yıkanır.
7. Lityum karbonatlı suda 5 dakika bekletilir.
8. Alkolik Eosin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 1 dakika boyanır.
9. 70⁰'den başlayarak her birinde 2'şer dakika olmak üzere 80⁰ ve 96⁰'lik alkollerden ve absolut

alkollerden geçirilerek eosinin fazlası alınır.

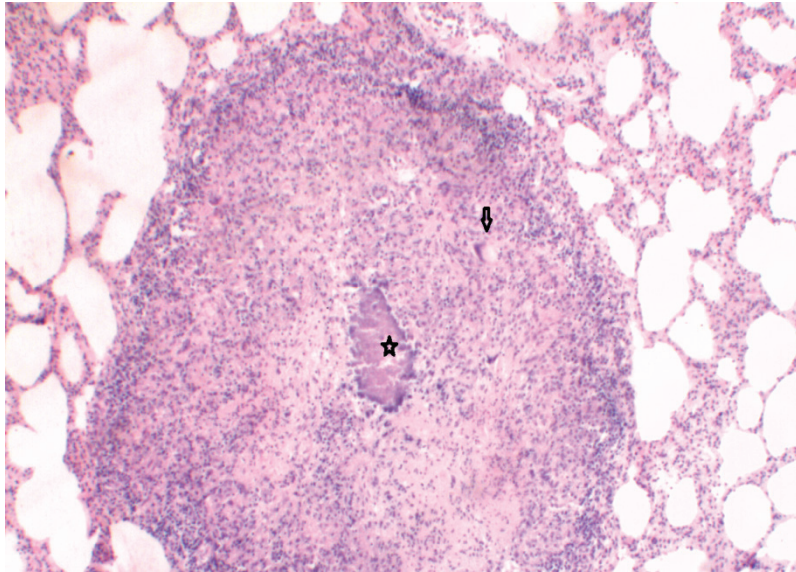
10. Ksilol kaplarında 2'şer dakika tutularak alkolden arındırılır ve şeffaflandırılır.
11. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

Doku kesitlerinde Ziehl-Neelsen Boyama Metodu:

1. Doku kesitleri, distile suya kadar ksilol ve dereceli alkol serilerinden geçirilerek parafinden arındırılır ve dehidre edilir.
2. Karbol fuksin solüsyonunda 30 dakika boyanır.
3. Çeşme suyunda iyice yıkanır.
4. Kesitler açık pembe oluncaya kadar asit alkol solüsyonunda dekolore edilir.
5. Çeşme suyunda 8 dakika yıkanır.
6. Kesitler, açık mavi oluncaya kadar çalışma metilen mavisi solüsyonunda boyanır.
7. Çeşme suyunda yıkanır ve distile suda çalkalanır.
8. Dereceli alkol serileri, absolut alkol ve ksilollerden geçirilir.
9. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

Hematoksilen-Eosin ile boyanan doku kesitlerinde; kazeöz nekroz, kireçlenme, epitelioid hücreler, Langhans dev hücreleri ve makrofajlardan oluşan produktif tüberkül yapıları (Resim 1) ya da eksudatif tüberküloz lezyonlarından ibaret karakteristik histolojik lezyonlar aranır. Ziehl-Neelsen boyanan doku kesitlerinde; açık mavi boyanmış zeminde epitelioid hücreler ile Langhans tipi dev hücrelerin sitoplazmalarında ya da ekstraselüler olarak tek ya da kümeler halinde kırmızı renge boyanmış aside dirençli bakteriler gözlenir.



Resim 1. Tüberkül, Produktif tüberküloz , Akciğer, HE, x100
(Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Arşivi).

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.07_BOVINE_TB.pdf
- Caswell, J.L., Williams, J.W. (2007) Respiratory System, In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Maxie, M.G. (ed), 5th ed., Elsevier Saunders, Edinburg, London, Newyork, Toronto, London, Sydney, Vol:2, p. 606-610.
- Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forced Institute of Pathology, 3rd ed., McGraw-Hill Book Company, Newyork, Toronto, London, Sydney, p. 38-39, 220.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

SIĞIRLARDA THEILERIOSIS'İN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Siğirlarda Theileriosis'in yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir. Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities" bölümü ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY \(bis\).pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_(bis).pdf)) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HE: Hematoksilen-Eosin.

Theileriosis: *Theileria spp.*, Babesiidae familyasına dahil protozoon parazitlerdir. Etken özellikle *Rhipicephalus* ve *Hyalomma* cinslerine dahil biyolojik kene vektörleriyle yayılır. Larva ya da nimf şeklindeki keneler enfekte konakçının eritrositlerindeki parazitleri alır. Enfekte kene beslenmeye başladığında parazitler tükürük bezinde çoğalır. Kene konakçının kanını emmeye başladığı sürede tükürüğündeki parazit ile enfekte olur.

Birçok siğir ırkı *Theileria parva*'ya karşı oldukça duyarlıdır ve mortalite %100'e ulaşabilir. Vektör *Rhipicephalus appendiculatus* kenesidir. Enfekte kenelerle hayvanlara taşınan mikroorganizmalar 4 ile 20 gün sonra enfeksiyon bölgesini drene eden lenf düğümlerinin lenfoblastlarında makroşizontlar şeklinde bulunur. Lenf düğümlerinde şizontların sayısı giderek artar ve sonunda tüm lenfositler parazitli olur. Enfekte lenfositlerin sitoplazmalarında kan boyaları kullanılarak makroşizontlar identifiye edilebilir. Bu şizontlar hastalığın tanısında öneme sahip Koch cisimcikleri olarak bilinir.

Yaklaşık 2 hafta olan inkübasyon periyodunun sonunda yüksek ateş gelişir. Salivasyon, lakrimasyon, depresyon ve ishalin yanı sıra yüzeysel lenf düğümlerinin progresif ve belirgin büyüme gözlenir.

Makroskobik olarak, Peyer plakları da dahil olmak üzere lenfoid dokularda büyüme önemlidir. Lenf düğümlerinin kesit yüzünde kırmızı kahverenkli olan korteks fokal kanamalar içerir, medüller bölge koyu kırmızı kahve renklidir. Seröz efüzyon ve bağ dokuda jelatinli ya da hemorajik ödem dikkati çeker. Akut hastalıkta dalak büyür, ancak hastalık uzadığında dalak büzüşür ve band benzeri bir görünüm alır. Karaciğer ve böbrekte infarktüs diye tanımlanan lezyonlar gerçekte perivasküler

lenfositlerin oluşturduğu proliferatif odaklardır. Bu odaklar karaciğer ve böbreğin yüzeyinde hafif kabarıklıklar oluşturarak makroskobik olarak görülebilen küçük gri beyaz renkli beneklenmelere yol açar. Akciğerler hiperemik ve ödemlidir. Kaslarda hyalin dejenerasyonu odaklarıyla ilişkili küçük kanamalar görülür. Dil altında ve vulvada peteşial kanamalara rastlanır. Bağırsak mukozasında lenfositik hiperplazi ve infiltrasyonun yanı sıra eroziv ve kataral enteritis vardır.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Sığırlarda Theileriosis hastalığının yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için gerekli mikroskobik bulguları açıklamaktır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

Nekropsi sonucu alınan büyümüş lenf düğümleri, akciğer, karaciğer, dalak, böbrek ve beyin örnekleri, %10 nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir. Daha sonra rutin doku işleme yöntemlerine göre işlenerek hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, Hematoksilen-Eosin (HE) ve Giemsa boyama metodu ile boyanır, ışık mikroskobunda incelenir. Hematoksilen-Eosin (HE) ile boyanan doku kesitlerinde; lenfoproliferatif infiltrasyonlar ve parazitlenmiş lenfositlerin, Giemsa boyanan kesitlerde intralenfositik ve ekstraselüler şizontların ve eritrositlerde piroplazm devrelerinin varlığı aranır.

7.1. Materyal

Nekropsi sonucu alınan büyümüş lenf düğümleri, akciğer, karaciğer, dalak, böbrek ve beyin örnekleri.

7.1.1 Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Etüv

Boyama seti /Boyama cihazı

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

%37-40 formalin

Sodyum fosfat monobazik

Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)

Dereceli alkoller (60°, 70°, 80°, 96°)

Absolut alkol

Ksilol

Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)

Hazır Hematoksilen-eosin boyası

Lityum karbonat

Hidroklorik asit
Entellan
Giemsa
Gliserol

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonu

%37-40 formalin	100.0 ml
Distile su	900.0 ml
Sodyum fosfat monobazik	4.0 g
Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)	6.5 g

Doymuş Lityum karbonat

Lityum karbonat	1.0 g
Distile su	100.0 ml

%1Asit alkol solüsyonu

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asit, konsantre	10.0 ml

Giemsa solüsyonu

Standart Giemsa boya solüsyonu ya da

Giemsa boya 7,36 gr.

Glyserol 500 ml.karıştırılarak 50°C'de su banyosunda bekletilir. Su banyosundan alınarak 50°C'de 30 dakika karıştırılır, soğutulur 500 ml. metanol ilave edilir ve karıştırılarak süzülür.

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1.Dokuların Tespiti:

Lezyonlu doku örnekleri, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir.

7.2.2.Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- Tespit edilen dokular, trimlenerek kasetlere yerleştirilir.
- Çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- Dokular, Doku Takip Cihazı'nda dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir; daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 60°	(120 dakika)
Etanol 70°	(120 dakika)
Etanol 80°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)

Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol – Parafin	(120 dakika)
Parafin	(120 dakika)

- En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur

7.2.3.Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56°-60°'lik etüvde kurutulur.

7.2.4.Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile kapatılması:

Daha sonra kesitler Hematoksilen-Eosin ve Giemsa boyama metodu ile boyanarak üzerlerine lamel kapatılır.

Hematoksilen-Eosin Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, önce ksilol kaplarında her birinde 5 dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. absolut alkol kaplarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol uzaklaştırılır ve sırasıyla dereceli alkollerden (96°, 80°, 70°)geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.
2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Instant hematoksilin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 4 dakika boyanır.
4. Çeşme suyunda yıkanır.
5. Asit alkolde dekolore edilerek boyanın fazlası alınır.
6. Çeşme suyunda yıkanır.
7. Lityum karbonatlı suda 5 dakika bekletilir.
8. Alkolik Eosin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 1 dakika boyanır.
9. 70°'den başlayarak her birinde 2'şer dakika olmak üzere 80° ve 96°'lik alkollerden ve absolut alkollerden geçirilerek eosinin fazlası alınır.
10. Ksilol kaplarında 2'şer dakika tutularak alkolden arındırılır ve şeffaflandırılır.
11. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

Doku kesitlerinde Giemsa Boyama Metodu

- 1- Doku kesitleri dereceli alkol serileri ve ksillollerden geçirilerek distile suya getirilir.
- 2- Kesitler koyu mavi oluncaya kadar 56°C'de 20 dakika Giemsa solüsyonunda boyanır (Distile suya 0,5-1 ml. Giemsa ilave edilir).
- 3- Distile suda çalkalanır ve % 0,01 (1/10000) asit alkolde kesitler pembe oluncaya kadar dekolore edilir.
- 4- Distile suda çalkalanır, alkol ve ksillollerden geçirilerek üzerlerine lamel kapatılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi:

Histolojik olarak enfeksiyonun erken devrelerinde diffuz lenfoid hiperplazi vardır. Lenfositolizis germinal merkezlerde belirgindir ve genel olarak küçük lenfositlerde kayıp görülür, arta kalanlar ise büyük ve blastik hücrelerdir. Karaciğerde çoğunlukla hepatik periasiner, daha az olarak periportal lenfositik infiltrasyona rastlanır. Ayrıca, kapsülde fokal lenfosit infiltrasyonları vardır. Bazı olgularda periasiner hepatohücrel nekroz ve kıvamlı safra kitlelerinin bulunduğu düzensiz kanaliküler kolestazis görülür. Dalakta erken dönemde lenfoid hipertrofi şekillenir, bunu daha sonra lenfolizis izler. Böbrekler şiddetli hiperemik olup fokal kanamalar içerir; interstisyel dokuda lenfosit infiltrasyonları vardır. Lenfositik infiltrasyonlar damarlar çevresinde belirgindir ve özellikle Bowman kapsülünün parietal tabakası çevresinde gözlenir. Hyalin silindirlerinin bulunduğu değişen derecedeki parenkim nekrozunun yanı sıra arta kalan epitelde kahve renkli pigmentleşmeye rastlanır. Akciğer değişiklikleri karakteristik olup septumlar ile interstisyel dokuların lenfositik infiltrasyonundan ibarettir. Bu durum yaygın ve şiddetli interstisyel alveolitis ile sonuçlanır.

Giemsa boyamalarda; tüm dokularda Koch cisimcikleri denilen şizontlar ile parazitlenmiş lenfositler görülür.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.16_THEILIERIOSIS.pdf
- Valli, V.E.O. (2007) Hematopoietic System, In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Maxie, M.G. (ed), 5th ed., Elsevier Saunders, Edinburg, London, Newyork, Toronto, London, Sydney, Vol:3, p.304-309.
- Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forced Institute of Pathology, 3rd ed., McGraw-Hill Book Company, Newyork, Toronto, London, Sydney, p. 38-39, 63-64.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

SIĞIR GANGRENLİ NEZLESİ (CORYZA GANGRENOSA BOVUM)'NİN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Başta sığırlar olmak üzere büyük ruminantlarda Sığır Gangrenli Nezlesi (Coryza Gangrenosa Bovum) hastalığının yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir. Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities” bölümü ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY \(bis\).pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_bis.pdf)) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HE: Hematoksilen-Eosin.

Sığır Gangrenli Nezlesi (Coryza Gangrenosa Bovum): *Herpesvirus* tip 3 tarafından oluşturulan, sığır ve mandaların ağız boşluğu başta olmak üzere sindirim sistemi ile üst hava yollarının akut, kataral, mukopurulent, eroziv-ülseratif ve psödomembranlı bir enfeksiyedir. Ayrıca keratokonjunktivitis, korneada bulanıklık, nonpurulent meningoensefalitis, fokal nonpurulent intersitisyel nefrit de gözlenir.

Dünyanın her tarafında yaygın olan hastalık sporadik seyirlidir. Hastalığın peros yolla bulaştığı ve bulaşmada koyunların etkin olduğu sanılmaktadır. Hastalığa 6 ay-2 yaş arasındaki sığırlar daha duyarlıdır. Mortalite oldukça yüksektir.

Etken vücuda girdikten sonra 3-8 haftalık bir inkübasyonu takiben viremi yapar. Daha sonra virus affinite gösterdiği sindirim sistemi, üst solunum sistemi, beyin, deri ve böbreklerde damarların endotel hücreleri ile adventisya tabakasındaki aktif bağ doku hücrelerinde dejenerasyon ve nekroza neden olur. Bu bölgelerde orta çaplı muskuler arterlerde fibrinoid nekrotik bir vaskulitis meydana gelir.

Hastalık 4 formda seyrederek:

1. Perakut Form

Başlangıçta 42°C'ye kadar çıkan bir ateş, kanlı ve fena kokulu bir ishali takiben, hayvan 1-3 gün içinde ölür. Nekropside; ağız mukozasında erozyon ve ülserler görülür. Benzeri lezyonlara özofagusun üst 1/3'ünde, abomazum ve bağırsaklarda da rastlanabilir. Fakat tanıtıcı değildir.

2. Akut İntestinal Form

Ateş, ishal, yaygın eksanterm, lakrimasyon ve lenf düğümleri büyümesi ile karakterizedir. Ağız mukozasında erozyon ve ülser görülür. Hayvan 4-9 gün içinde ölür.

3. Baş-Göz Formu

Ülkemizde en çok görülen formdur ve akut intestinal formla birlikte görülür. Ateş 41°C'ye kadar yükselir. Bunu kataral konjunktivitis ve rinitis izler. Burun ve göz akıntısı zamanla kurur ve kabuklaşır. Burun delikleri kıvamlı mukopurulent bir eksudatla dolar ve solunum güçlüğü görülür. Hastalığın sonuna doğru keratitisi nedeniyle kornea; kornea-skleral sınırdan başlamak üzere bulanıklaşır, gözler mat, beyaz bir hal alır ve mermede geniş erozyonlar görülür.

Yüksek ateşle birlikte ağız boşluğunda kataral bir stomatitis gelişir. Bunu takiben boz beyaz nekroz odakları ve bunların açılmasıyla erozyon ve ülserler oluşur. Baş bölgesinde özellikle boynuzlar çevresinde ısı daha yüksektir. Ensefalomyelitise ilgili inkoordinasyon, musküler tremor ve tortikollis görülür. Çene altı ve preskapular olanlar başta olmak üzere tüm lenf düğümleri şişkindir.

4. Abortif Form:

Seyrek görülür. Hasta hayvanlarda abort şekillenir. Klinik semptom pek farkedilmez.

Nekropside karkas dehidre, kirli ve pis kokuludur. Ağız boşluğunun geniş bir kısmı erozyon ve ülserlerle kaplıdır. Yer yer gri sarı renkli psödomembranlar vardır. Bu lezyonlar özellikle dilin bütün yüzeyinde, yanak papillalarının uçlarında, diş etlerinde, yumuşak ve sert damakta ve yanaklarda yerleşmiştir.

Burun, farinks, larinks, trakea, hatta bronşların mukozalarında peteşiyel kanamalarla birlikte erozyon, ülser ve psödomembranlar ile akciğerlerin apikal loblarında kataral veya fibrinli pnömoni görülebilir. Sığır gangrenli nezlesi'nde de sığır vebasında olduğu gibi özofagusun üst 1/3'lük kısmında erozyonlar şekillenir. Ön mideler dikkatle incelendiğinde aynı tip lezyonlara rastlanır. Abomazum mukozası hiperemik ve ödemlidir, diffuz ya da fokal peteşilerle bezelidir. Hemorajik ülserler bulunabilir.

Bağırsak duvarı ödemli ve kalınlaşmıştır. Mukozada peteşiler ve yer yer kanamalar vardır. Lezyonlar kalın bağırsak ve rektumda daha belirgindir. Mukozada uzunlamasına konjesyon çizgileri bulunur; şiddetli ülserleşmelere ve kanamalara rastlanabilir.

Böbreklerde kapsula altında, kortekste 2- 4 mm çapında kırmızı veya boz beyaz renkte odaklar ile pelvis renalis, ureter ve idrar kesesinde hiperemi bazen de kanamalar görülür. Tüm lenf düğümleri büyümüş, ödemli ve parankim hipertroftiktir.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Büyük ruminantlarda Sığır Gangrenli Nezlesi hastalığının yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için gerekli mikroskopik bulguları açıklamaktır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilen kornea, beyin, böbrek, karaciğer, akciğer, lenf düğümleri, dil ve dudak gibi ağız mukozası kısımları, rutin doku işleme yöntemlerine göre işlenerek hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, Hematoksilen-Eosin (HE) boyası ile boyanır ve ışık mikroskobunda muayene edilir. Histolojik doku kesitlerinde; damarlarda fibrinoid nekrotik vaskulitis, beyin ve böbrek gibi paranşimatöz organlarda intersitisyel lenfoid hücre infiltrasyonlarıyla karakterize lezyonların varlığı aranır.

7.1. Materyal

Kornea, beyin, böbrek, karaciğer, akciğer, lenf düğümleri, dil ve dudak gibi ağız mukozası bölümleri incelenir.

7.1.1 Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Etüv

Boyama seti /Boyama cihazı

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

%37-40 formaldehid

Sodyum fosfat monobazik

Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)

Dereceli alkoller (60°, 70°, 80°, 96°)

Absolut alkol

Ksilol

Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)

Hazır Hematoksilen-eosin boyası

Lityum karbonat

Hidroklorik asit

Entellan

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonu

%37-40 formalin	100.0 ml
Distile su	900.0 ml
Sodyum fosfat monobazik	4.0 g
Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)	6.5 g

Doymuş Lityum karbonat

Lityum karbonat	1.0 g
Distile su	100.0 ml

Asit alkol

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asit, konsantre	10.0 ml

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1.Dokuların Tespiti:

Kornea, beyin, böbrek, karaciğer, akciğer, lenf düğümleri, dil ve dudak vb. ağız mukozası kısımları, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir.

7.2.2.Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- Tespit edilen dokular, trimlenerek kasetlere yerleştirilir.
- Çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- Dokular, Doku Takip Cihazı'nda dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir; daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 60 ⁰	(120 dakika)
Etanol 70 ⁰	(120 dakika)
Etanol 80 ⁰	(120 dakika)
Etanol 96 ⁰	(120 dakika)
Etanol 96 ⁰	(120 dakika)
Absolut etanol 100 ⁰	(120 dakika)
Absolut etanol 100 ⁰	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol – Parafin	(120 dakika)
Parafin	(120 dakika)

- En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3.Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56⁰-60⁰'lik etüvde kurutulur.

7.2.4.Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile Kapatılması:

Daha sonra kesitler Hematoksilen-Eosin ile boyanarak üzerlerine lamel kapatılır.

Hematoksilen-Eosin Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, önce ksilol kaplarında her birinde 5 dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. Absolut alkol kaplarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol uzaklaştırılır ve sırasıyla dereceli alkollerden (96⁰, 80⁰, 70⁰)geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.

2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Instant hematoksilen (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 4 dakika boyanır.
4. Çeşme suyunda yıkanır.
5. Asit alkolde dekolore edilerek boyanın fazlası alınır.
6. Çeşme suyunda yıkanır.
7. Lityum karbonatlı suda 5 dakika bekletilir.
8. Alkolik Eosin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 1 dakika boyanır.
9. 70^oden başlayarak her birinde 2'şer dakika olmak üzere 80^o ve 96^olik alkollerden ve absolut alkollerden geçirilerek eosinin fazlası alınır.
10. Ksilol kaplarında 2'şer dakika tutularak alkolden arındırılır ve şeffaflandırılır.
11. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi:

Hastalığın tanıtıcı histopatolojik bulgusu orta çaplı muskuler arterlerde görülen fibrinoid nekrotik vaskulitistir. Bu lezyonların en iyi görülebileceği organlar beyin, leptomeninks, böbrek ile sindirim sistemi, deri ve solunum sisteminin lezyonlu bölgeleri ile karaciğer ve adrenal bezlerdir. Lezyonlu arterlerin media tabakası, içerisinde çekirdek kırıntıları bulunan eozinofilik, homojen bir kitle halindedir. Adventisyada mononükleer hücrelerle, eozinofil infiltrasyonları bulunur. Beyinde nonpurulent bir meningoensefalitis görülür. Beyindeki lezyonlar en çok pons, bulbus olfaktorius, N. caudatus ve cornu ammonis'tedir. Böbrek korteksinde fokal nonpurulent bir intersitisyel nefritis görülür.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.15_MCF.pdf
- Brown, C.C., Baker, D.C., Barker, I.K. (2007) Alimentary System, In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Maxie, M.G. (ed), 5th ed., Elsevier Saunders, Edinburg, London, Newyork, Toronto, London, Sydney, Vol:2, p.152-158.
- Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd ed., McGraw-Hill Book Company, Newyork, Toronto, London, Sydney, p. 38-39.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

SIĞIR VEBASI (RINDER PEST) HASTALIĞI'NIN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Başta sığırlar olmak üzere büyük ruminantlarda Sığır Vebası (Rinder Pest, Cattle Plaque) Hastalığı'nın yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir. Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities" bölümü ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_\(bis\).pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_(bis).pdf)) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HE: Hematoksilen-Eosin.

Sığır Vebası Hastalığı: Özellikle sığır, manda ve domuzlarda eroziv-ülseratif stomatitis, tonsillitis ve gastroenteritisle seyreden, ani ölümle sonuçlanan *Morbillivirus*'ların oluşturduğu viral bir enfeksiyondur.

Hasta hayvanın burun akıntısı, salya, feçes ve idrarı yüksek oranda virus içerir. Virusun giriş yeri nazofarinks mukozasıdır. İnkübasyon süresi 6- 15 gündür, daha sonra 2-3 gün süren bir viremi gelişir. Virusun affinitesi özellikle sindirim sistemi mukozası ile lenfoid dokulara, daha az oranda ise üst solunum ve ürogenital sistemdir. Virus epitel hücreleri ile lenfositlerde nekroza neden olur. Hastalık, klinik olarak yüksek ateş (42°C), burun ve gözyaşı akıntısı, salya ve ishale seyreder. Ateş paralel olarak lökopeni de görülür. Ateş ishalin başlamasıyla düşer. Ölüm 6- 12 gün içinde şekillenir. Nekropsi bulguları karakteristiktir, fakat patognomonik değildir. Karkasta şiddetli bir dehidrasyon ve kaşeksi vardır. Ağız mukozasında başlangıçta küçük, beyaz, kepek serpilmiş gibi nekrotik odaklar, eroziv ve ülseratif lezyonlar gelişir.

Bu lezyonlar tipik olarak alt dudağın iç yüzünde, diş etinde, dilin serbest kısmının ventralindedir. Ancak şiddetli olaylarda dilin serbest kısmının dorsal yüzü hariç olmak üzere ağız mukozasının tamamı etkilenebilir. Özofagusun üst 1/3'lik bölümünde erozyon ve ülserler görülür. Ön midelerde lezyonlar nadiren görülür ve genellikle omazum yapraklarını kapsar.

İnce bağırsaklarda lezyonlar daha az şiddette fakat benzerdir ve genellikle duodenumun giriş kısmı ile ileumun son kısmındadır. Lezyonların yaygın ve şiddetli olduğu yerlerden bir diğeri de kalın bağırsaklardır. Burada özellikle ileosekal valvülde, sekumdan kolona geçiş bölgesinde ve rektumda lezyonlar daha belirgindir. İyi gelişmiş vakalarda sekum, mukoza kıvrımları boyunca baştan başa peteşilerle kaplıdır. Bu durum mukozaya “Zebra Çizgileri” görüntüsünü verir. Hastalık ilerledikçe mukozada erozyonlar ve ülserler gelişir.

Sekumdan kolona geçiş bölgesinde, yaklaşık 10- 11 cm. uzunluğundaki mukoza kısmında küçük, mukozaya gömülmüş gibi difteroid-nekrotik odaklar görülür.

Kolon ve rektumda, mukoza kıvrımları boyunca şiddetli erozyon ve hemorajiler şekillenir. Bazen lümen koyu pıhtılı bir kanla doludur.

Tonsillerde, peyer plaklarında ve gastrointestinal lenfoid folliküllerde boz-beyaz nekrotik odaklar şekillenir. Hastalığın uzadığı, ölümün 12. günden sonra geliştiği hayvanlarda intersitisyel ve alveoler amfizemler, hatta fibrinli bir pnömoni de gelişebilir.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Büyük ruminantlarda Sığır Vebası hastalığının yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için gerekli mikroskopik bulguları açıklamaktır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilen lezyonlu ağız mukozası kısımları (dil, dudak, yanaklar, damak) ve tonsiller, rutin doku işleme yöntemlerine göre işlenerek hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, HE boyası ile boyanır ve ışık mikroskopunda muayene edilir. Doku kesitlerinde; nekrotik epitel katlarında sinsityal hücre oluşumlarının ve nekrotik epiteliler ile sinsityalarda intrasitoplazmik-intranuklear inklüzyon cisimciklerinin varlığı aranır.

7.1. Materyal

Lezyonlu ağız mukozası kısımları (dil, dudak, yanaklar, damak) ve tonsiller incelenir.

7.1.1 Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Etüv

Boyama seti/ Boyama Cihazı

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

%37-40 formaldehid

Sodyum fosfat monobazik

Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)

Dereceli alkoller (60°, 70°, 80°, 96°)

Absolut alkol
Ksilol
Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)
Hazır Hematoksilen-eosin boyası
Lityum karbonat
Hidroklorik asit
Entellan

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonu

%37-40 formalin	100.0 ml
Distile su	900.0 ml
Sodyum fosfat monobazik	4.0 g
Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)	6.5 g

Doymuş Lityum karbonat

Lityum karbonat	1.0 g
Distile su	100.0 ml

Asit alkol

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asit, konsantre	10.0 ml

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1.Dokuların Tespiti:

Lezyonlu ağız mukozası kısımları (dil, dudak, yanaklar, damak) ve tonsiller, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir.

7.2.2.Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- Tespit edilen dokular, trimlenerek kasetlere yerleştirilir.
- Çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- Dokular, Doku Takip Cihazı'nda dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir; daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 60°	(120 dakika)
Etanol 70°	(120 dakika)
Etanol 80°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)

Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol – Parafin	(120 dakika)
Parafin	(120 dakika)

- En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3.Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56⁰-60⁰'lik etüvde kurutulur.

7.2.4.Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile Kapatılması:

Daha sonra kesitler HE ile boyanarak üzerlerine lamel kapatılır.

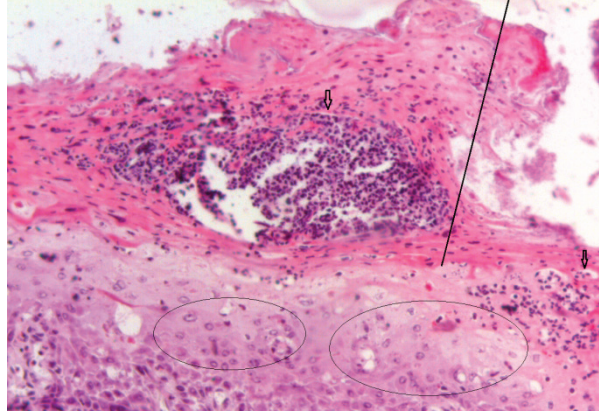
Hematoksilen-Eosin Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, önce 3 adet ksilol kaplarında her birinde 5 dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. 2 adet absolut alkol kaplarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol uzaklaştırılır ve sırasıyla dereceli alkollerden (96⁰, 80⁰, 70⁰)geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.
2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Instant hematoxilen (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 4 dakika boyanır.
4. Çeşme suyunda yıkanır.
5. Asit alkolde dekolore edilerek boyanın fazlası alınır.
6. Çeşme suyunda yıkanır.
7. Lityum karbonatlı suda 5 dakika bekletilir.
8. Alkolik Eosin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 1 dakika boyanır.
9. 70⁰'den başlayarak her birinde 2'şer dakika olmak üzere 80⁰ ve 96⁰'lik alkollerden ve absolut alkollerden geçirilerek eosinin fazlası alınır.
10. Ksilol kaplarında 2'şer dakika tutularak alkolden arındırılır ve şeffaflandırılır.
11. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

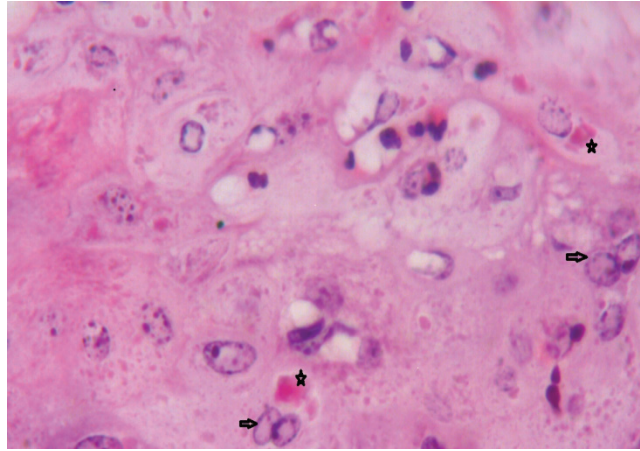
7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi:

Hematoxilen-Eosin ile boyanan doku kesitlerinde; ağız mukozasındaki epitel hücreleri nekroze olur. Nekrotik hücrelerin sitoplazmaları koagüle ve eozinofiliktir. Nekroz zamanla hem genişler, hem de çok katlı epitelin üst tabakalarına doğru ilerler. Nekrotik odağın çevresindeki Str. spinosum hücrelerininbirleşmesiyle çok çekirdekli sinsityal dev hücreleri şekillenir. Gerek bu dev hücrelerinde ve gerekse epitel hücrelerinde sitoplazmik, eozinofilik inklüzyon cisimcikleri oluşur (Resim 1 ve 2). Daha az oranda da olsa aynı hücrelerde nüklear inklüzyonlar da gözlenir. Gastrointestinal mukozada benzer lezyonlar vardır.

Tonsiller, peyer plakları ve gastrointestinal kanalın diğer lenfoid dokularındaki germinal merkezlerde ve lenfositlerde şiddetli nekroz vardır. Tonsillerin kriptleri nekrotik bir kitle ile doludur. Sağlam kalmış kript epitellerinde sinsityal dev hücreleri şekillenebilir. Gerek bu dev hücrelerinde, gerekse diğer epitellerde sitoplazmik ve nükleer eozinofilik inklüzyonlar görülebilir. Hastalığın endemik olduğu bölgelerde lezyonlar, genellikle ağız boşluğunda gelişmekte, sindirim sisteminin alt kısmı pek etkilenmemektedir.



Resim 1. Dejeneratif ve nekrotik ağız mukozası (halka içleri), yangısal hücre infiltrasyonu (oklar), psödomembran (/), Sığır vebası hastalığı, HE, x100 (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Arşivi).



Resim 2. Inklüzyon cisimcikleri (yıldızlar) ve sinsityal tipi dev hücresi (oklar), Sığır vebası hastalığı, Ağız mukozası, HE, x400 (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Arşivi).

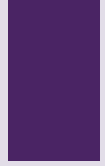
8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.15_RINDERPEST.pdf
- Brown, C.C., Baker, D.C., Barker, I.K. (2007) Alimentary System, In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Maxie, M.G. (ed), 5th ed., Elsevier Saunders, Edinburg, London, Newyork, Toronto, London, Sydney, Vol:2, p. 135-136.
- Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forced Institute of Pathology, 3rd ed., McGraw-Hill Book Company, Newyork, Toronto, London, Sydney, p. 38-39.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

Koyun Keçi Hastalıkları



EKTİMA (CONTAGIOUS PUSTULAR DERMATITIS) HASTALIĞI'NIN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Başta koyun ve keçiler olmak üzere küçük ruminantlarda Ektima (Contagious Pustular Dermatitis) Hastalığı'nın yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir. Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities" bölümü ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY \(bis\).pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_bis.pdf)) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HE: Hematoksilen-Eosin.

Ektima (Contagious Pustular Dermatitis, Enfeksiyöz Labial Dermatitis, Sore Mouth, Scabby Mouth, Orf) Hastalığı : Koyun ve keçilerin bir Pox virus hastalığı olup insan, inek, yabani geviş getirenler ve çok ender olarak da köpeklerde rastlantısal enfeksiyonlar şeklinde görülmektedir. Hastalık yalancı sığır çiçeği ve sığır papüler stomatitisi viruslarına yakın benzerliği olan bir *Parapoxvirus* tarafından oluşturulur.

Hastalığın ekonomik önemi vardır; hastalıklı hayvanlar ne süt emebilir ne de otlayabilir, bu da kondisyon kaybıyla sonuçlanır. Duyarlı bir hayvan topluluğunda morbidite %90'a erişebilir, ancak mortalite sekonder enfeksiyonlar olmadıkça %1'i geçmez.

Makroskobik olarak en belirgin lezyon deri üzerinde 2-4 mm kalınlığa erişen esmer-gri renkte kalın bir kabuk tabakasıdır. Bu lezyonlar dudakların komissuralarında başlar ve dudak kenarlarından burun ucuna kadar yayılır. Zaman zaman primer lezyonlara göz çevresinde rastlanır. Şiddetli olgularda, lezyonlar gingiva, damak ve dilde şekillenir. Alt sindirim sistemindeki lezyonlar ülserli gastro-enteritis şeklindedir. Lezyonlar tipik çiçek devreleri şeklinde gelişir, ancak çok daha proliferatif özelliktedir. Veziküler devre geçicidir ve pustüller göbekli olmaktan çok düz bir yapıdadır.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Küçük ruminantlarda Ektima (Contagious Pustular Dermatitis) hastalığının yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için gerekli mikroskobik bulguları açıklamaktır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilen lezyonlu ağız mukozası (dil, dudak, diş etleri ve damak örnekleri rutin doku işleme yöntemlerine göre işlenerek hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, HE ile boyanır ve ışık mikroskobunda muayene edilir. Doku kesitlerinde, epitellerde vakuolleşme, proliferasyon, intraepidermal mikroapse ve kabuk oluşumu ve bazofilik introstoplazmik inklizyon cisimciklerinin varlığı aranır.

7.1. Materyal

Lezyonlu ağız mukozası (dil, dudak, diş etleri, damak) örnekleri incelenir.

7.1.1 Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Etüv

Boyama seti/ Boyama Cihazı

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

%37-40 formalin

Sodyum fosfat monobazik

Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)

Dereceli alkoller (60°, 70°, 80°, 96°)

Absolut alkol

Ksilol

Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)

Hazır Hematoksilen-eosin boyası

Lityum karbonat

Hidroklorik asit

Entellan

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonu

%37-40 formalin	100.0 ml
Distile su	900.0 ml
Sodyum fosfat monobazik	4.0 g
Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)	6.5 g

Doymuş Lityum karbonat

Lityum karbonat	1.0 g
Distile su	100.0 ml

Asit alkol

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asit, konsantre	10.0 ml

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1.Dokuların Tespiti:

Lezyonlu ağız mukozası (dil, dudak, diş etleri, damak) örnekleri, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir.

7.2.2.Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- Tespit edilen dokular, trimlenerek kasetlere yerleştirilir.
- Çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- Dokular, Doku Takip Cihazı'nda dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir; daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 60°	(120 dakika)
Etanol 70°	(120 dakika)
Etanol 80°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol – Parafin	(120 dakika)
Parafin	(120 dakika)

- En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3.Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56°-60°'lik etüvde kurutulur.

7.2.4. Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile Kapatılması:

Kesitler HE ile boyanarak üzerlerine lamel kapatılır.

Hematoksilen-Eosin Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, önce 3 adet ksilol kaplarında her birinde 5 dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. 2 adet absolut alkol kaplarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol uzaklaştırılır ve sırasıyla dereceli alkollerden (96⁰, 80⁰, 70⁰) geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.
2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Instant hematoksilin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 4 dakika boyanır.
4. Çeşme suyunda yıkanır.
5. Asit alkolde dekolore edilerek boyanın fazlası alınır.
6. Çeşme suyunda yıkanır.
7. Lityum karbonatlı suda 5 dakika bekletilir.
8. Alkolik Eosin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 1 dakika boyanır.
9. 70⁰'den başlayarak her birinde 2'şer dakika olmak üzere 80⁰ ve 96⁰'lık alkollerden ve absolut alkollerden geçirilerek eosinin fazlası alınır.
10. Ksilol kaplarında 2'şer dakika tutularak alkolden arındırılır ve şeffaflandırılır.
11. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi:

Mikroskobik lezyonlar stratum spinosum'daki epitel hücrelerinde değişen şiddette dejeneratif değişiklikler, belirgin epidermal proliferasyon, intraepidermal mikro apseler ve kabuk oluşumuyla karakterize olur. Ayrıca sitoplazmik eozinofilik inklüzyon cisimcikleri dikkati çeker.

Dermiste yüzeysel ödem, belirgin kapillar genişleme ve perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonu görülür. Retiküler dejenerasyon bölgelerine nötrofiller infiltre olur ve mikroapseleri oluşturur. Orto- ve parakeratotik hiperkeratozis, proteinli sıvı, dejenere nötrofiller, hücresel yıkıntılar ve bakteriyel kolonilerden oluşan kalın bir kabuk şekillenir.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- Ginn, P.E., Monsell, J.E.K.L., Rakich P.M. (2007) Skin and Appendages, In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Maxie, M.G. (ed), 1st ed., Elsevier Saunders, Edinburg, London, Newyork, Toronto, London, Sydney, Vol:2, p. 664-674.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KOYUN VE KEÇİ ÇİÇEK HASTALIĞI (SHEEP AND GOAT POX DISEASE)'NIN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Koyun ve keçilerde Çiçek Hastalığı (Sheep and Goat Pox Disease)'nın yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir. Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities” bölümü ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY \(bis\).pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_(bis).pdf)) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HE: Hematoksilen-Eosin.

Çiçek Hastalığı: *Poxviridae* familyası içinde yer alan virus epiteliotropik özellikte olup kanatlılarda, yabani ve evcil hayvanlarda ve insanlarda kutan ve sistemik enfeksiyonlara yol açmaktadır. Enfeksiyonun bulaşması hastalıklı koyunlardan direkt temasla ya da bulaşık çevreden olur. Virus kurumaya karşı çok dirençli olup yapağında 2 ay ve kurumuş kabuklarda 6 ay süreyle canlılığını korur. Hastalığa duyarlılık açısından ırk farklılığı söz konusudur. İnce yapağılı merinos koyunları özellikle duyarlıdır. Koyun çiçeği her yaş hayvanda görülür, ancak hastalık özellikle kuzularda çok şiddetli seyreder. Kuzularda mortalite % 80-100 arasındadır.

Koyun çiçeği sistemik bir hastalıktır. Enfeksiyon daima solunum yoluyla olur, ancak deri sıyrıkları yoluyla da oluşabilir. Klinik bulgular ateş, lakrimasyon, salivasyon, seröz burun akıntısı ve hiperestezidir. Deri lezyonları birkaç gün sonra özellikle yapağının az olduğu bölgelerde şekillenmeye eğilimlidir. Tipik olarak göz kapakları, yanaklar, burun delikleri, vulva, meme, skrotum, prepusyum, kuyruğun ventral yüzü ve bacakların iç yüzlerinde gelişir.

Makroskobik lezyonlar çiçek enfeksiyonlarının tipik gelişimini izler. Koyun çiçeğinde belirgin veziküler devre vardır. Veziküller göbekli olup çok boşluktadır, delindiklerinde çok az sıvı çıkar. Püstül devresi ince bir kabuk oluşumu ile karakterizedir. Belirgin dermal ödem vardır. Çok duyarlı

hayvanlarda enfeksiyonun erken döneminde sık sık hemorajik papüller şekillenir, daha sonra gastrointestinal ve respiratorik sistemde ülserli lezyonlar oluşur. Olguların yaklaşık %30'unda multiple akciğer lezyonları şekillenir, bunlar konsolidasyon odaklarıdır. Böbrek kortekslerinde multifokal nodüllere rastlanır.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Koyun ve keçilerde Çiçek Hastalığı'nın yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için gerekli mikroskopik bulguları açıklamaktır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilen lezyonlu deri (epidermis) kısımları, dil, dudaklar, damak, rumen ve abomasum mukozaları, akciğer, karaciğer ve böbrek örnekleri, rutin doku işleme yöntemlerine göre işlenerek hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, HE ile boyanır ve ışık mikroskopunda muayene edilir. Doku kesitlerinde, deri ve kutan mukozalarda hidropik-balonumsu dejenerasyona uğrayan spinosum katı epitel hücreleri ile dermiste görülen karakteristik koyun çiçek hücrelerinde intrasitoplazmik eosinofilik inklüzyon cisimciklerinin varlığı aranır.

7.1. Materyal

Lezyonlu deri kısımları, dil, dudaklar, damak, rumen ve abomasum mukozaları, akciğer, karaciğer ve böbrek örnekleridir.

7.1.1 Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Etüv

Boyama seti/ Boyama Cihazı

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

%37-40 formalin

Sodyum fosfat monobazik

Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)

Dereceli alkoller (60°, 70°, 80°, 96°)

Absolut alkol

Ksilol

Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)

Hazır Hematoksilen-eosin boyası

Lityum karbonat

Hidroklorik asit

Entellan

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonu

%37-40 formalin	100.0 ml
Distile su	900.0 ml
Sodyum fosfat monobazik	4.0 g
Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)	6.5 g

Doymuş Lityum karbonat

Lityum karbonat	1.0 g
Distile su	100.0 ml

Asit alkol

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asit, konsantre	10.0 ml

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1. Dokuların Tespiti:

Lezyonlu deri kısımları, dil, dudaklar, damak, rumen ve abomasum mukozaları, akciğer, karaciğer ve böbrek örnekleri, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir.

7.2.2. Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- Tespit edilen dokular, trimlenerek kasetlere yerleştirilir.
- Çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- Dokular, Doku Takip Cihazı'nda dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir; daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 60°	(120 dakika)
Etanol 70°	(120 dakika)
Etanol 80°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol – Parafin	(120 dakika)
Parafin	(120 dakika)

- En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3.Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56°-60°'lik etüvde kurutulur.

7.2.4.Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile Kapatılması:

Kesitler HE ile boyanarak üzerlerine lamel kapatılır.

Hematoksilen-Eosin Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, önce 3 adet ksilol kaplarında her birinde 5 dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. 2 adet absolut alkol kaplarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol uzaklaştırılır ve sırasıyla dereceli alkollerden (96°, 80°, 70°) geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.
2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Instant hematoksin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 4 dakika boyanır.
4. Çeşme suyunda yıkanır.
5. Asit alkolde dekolore edilerek boyanın fazlası alınır.
6. Çeşme suyunda yıkanır.
7. Lityum karbonatlı suda 5 dakika bekletilir.
8. Alkolik Eosin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 1 dakika boyanır.
9. 70°'den başlayarak her birinde 2'şer dakika olmak üzere 80° ve 96°'lik alkollerden ve absolut alkollerden geçirilerek eosinin fazlası alınır.
10. Ksilol kaplarında 2'şer dakika tutularak alkolden arındırılır ve şeffaflandırılır.
11. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi:

Histopatolojik muayenede; koyun çiçeği lezyonlarında tipik epitel değişiklikleri vardır; stratum spinosumda belirgin hidropik dejenerasyon, mikroveziküller, eozinofilik sitoplazmik inklüzyon cisimcikleri (Guarnieri) ve epidermis hiperplazisi görülür. Lezyonlara hem yüzey epitel hem de kıl follikül epitelinde rastlanır. İlk dermal lezyonlar makroskobik olarak eritematöz makül şeklinde görülen ödem, hiperemi ve nötrofil infiltrasyonudur. Papül devresinde, ödemli olan dermiste mononükleer hücreler toplanır. İlk kez Borrel tarafından tanımlanan bu hücreler “cellules claveuses” ya da “koyun çiçeği hücreleri” olarak bilinirler ve hastalık için karakteristiktirler. Koyun çiçeği hücrelerinin çekirdekleri vakuollü olup kromatin çekirdek membranında yoğunlaşır. Vakuollü sitoplazmada tek ya da ender olarak çok sayıda eozinofilik inklüzyon cisimciğine rastlanır. Koyun çiçeği hücreleri virüsle enfekte monosit, makrofaj ve fibroblastlardır. Enfeksiyondan yaklaşık 10 gün sonra, epitel lezyonlarının en belirgin olduğu dönemde arteriol ve postkapillar venüllerde şiddetli nekrotik vaskülitis şekillenir.

Akciğer lezyonları proliferatif alveolitis ve bronşiolitis olup yer yer fokal kazeöz nekroz odakları görülür. Alveol septumu hücrelerinde sitoplazmik inklüzyon cisimcikleri vardır. Kalp, böbrek, karaciğer, adrenal bezler, tiroid ve pankreasta koyun çiçeği hücre topluluklarından oluşan lezyonlar gözlenir.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.14_S_POX_G_POX.pdf
- Ginn, P.E., Monsell, J.E.K.L., Rakich, P.M. (2007) Skin and Appendages, In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Maxie, M.G. (ed), 1.st edition, Elsevier Saunders, Edinburg, London, Newyork, Toronto, London, Sydney, Vol:2, p. 664-674.
- Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forced Institute of Pathology, 3.rd edition, McGraw-Hill Book Company, Newyork, Toronto, London, Sydney, p. 38-39.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KÜÇÜK RUMİNANT VEBASI (PESTE des PETITS RUMINANTS) HASTALIĞI'NIN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Küçük Ruminant Vebası (Stomatitis Pneumoenteritis Kompleks, Kata, Peste des Petits Ruminants-PPR) Hastalığı'nın yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir. Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities" bölümü (http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_bis.pdf) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HE: Hematoksilen-Eosin.

PPR(Peste des petits ruminants): Küçük Ruminant Vebası hastalığı.

Küçük Ruminant Vebası: *Morbili* viruslar tarafından oluşturulan özellikle koyun ve keçilerde görülen akut, sığır vebasına çok benzeyen viral bir hastalıktır. Koyun ve keçilerin sığır vebası virusu ile enfekte edilmesi veya sığır vebası aşısı ile aşılama küçük ruminantları bu hastalığa karşı korur.

Virusun giriş yeri nazofaringeal mukozadır. Buradaki enfeksiyonu takiben viremi başlar, daha sonra virus affinite gösterdiği sindirim ve solunum sistemi epitel hücreleri ile lenforetiküler dokuya yayılır. Hastalığın çoğu özelliği sığır vebasına benzer. Yalnız farklı olarak solunum sistemi de şiddetli derecede etkilenir ve keçilerde perakut seyreder.

Klinik olarak dispne, hiperpne ve öksürük ile seröz, mukopurulent göz ve burun akıntısı vardır.

Nekropside dudak, diş eti, dilin serbest ucu, yanak papillaları ve larinkste eroziv-ülseratif lezyonlar belirgindir. Abomazumda, ince bağırsaklarda hemoraji, peyer plaklarında nekroz mevcuttur. En önemli nekropsi bulgusu ise kolon ve rektumda zebra çizgilerini andıran kanamaların görülmesidir.

Akciğerlerde özellikle anteroventral bronkopnömoni yaygın olarak görülür. Bazen fibrinli bir plöritis de şekillenebilir.

Lenforetiküler dokularda ise dalak büyümüş, mediastinal ve mezenteriyel lenf düğümleri konjesyone ve ödemlidir.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Küçük Ruminant Vebası Hastalığı'nın yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için gerekli mikroskopik bulguları açıklamaktır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilen lezyonlu ağız mukozası kısımları (dil, dudak, yanaklar, yumuşak damak), tonsiller ve akciğer örnekleri rutin doku işleme yöntemlerine göre işlenerek hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, HE ile boyanır ve ışık mikroskopunda muayene edilir. Doku kesitlerinde, nekrotik epitel katlarında sinsityal hücre oluşumlarının ve nekrotik epiteller ile sinsityalarda intrasitoplazmik-intranuklear inklüzyon cisimciklerinin varlığı aranır.

7.1. Materyal

Nekrotik-eroziv ve/veya ülseratif lezyonların bulunduğu ağız mukozası kısımları (dil, dudak, yanaklar, damak), tonsiller ve akciğer örnekleri incelenir.

7.1.1 Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Etüv

Boyama seti/ Boyama Cihazı

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

%37-40 formalin

Sodyum fosfat monobazik

Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)

Dereceli alkoller (60°, 70°, 80°, 96°)

Absolut alkol

Ksilol

Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)

Hazır Hematoksilen-eosin boyası

Lityum karbonat

Hidroklorik asit

Entellan

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonu

%37-40 formalin	100.0 ml
Distile su	900.0 ml
Sodyum fosfat monobazik	4.0 g
Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)	6.5 g

Doymuş Lityum karbonat

Lityum karbonat	1.0 g
Distile su	100.0 ml

Asit alkol

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asit, konsantre	10.0 ml

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1.Dokuların Tespiti:

Lezyonlu ağız mukozası kısımları (dil, dudak, yanaklar, damak), tonsiller ve akciğer örnekleri, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir.

7.2.2.Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- Tespit edilen dokular, trimlenerek kasetlere yerleştirilir.
- Çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- Dokular, Doku Takip Cihazı'nda dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir; daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 60 ⁰	(120 dakika)
Etanol 70 ⁰	(120 dakika)
Etanol 80 ⁰	(120 dakika)
Etanol 96 ⁰	(120 dakika)
Etanol 96 ⁰	(120 dakika)
Absolut etanol 100 ⁰	(120 dakika)
Absolut etanol 100 ⁰	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol – Parafin	(120 dakika)
Parafin	(120 dakika)

- En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3.Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56⁰-60⁰'lik etüvde kurutulur.

7.2.4. Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile Kapatılması:

Kesitler HE ile boyanarak üzerlerine lamel kapatılır.

Hematoksilen-Eosin Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, önce 3 adet ksilol kaplarında her birinde 5 dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. 2 adet absolut alkol kaplarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol uzaklaştırılır ve sırasıyla dereceli alkollerden (96⁰, 80⁰, 70⁰) geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.
2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Instant hematoxilen (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 4 dakika boyanır.
4. Çeşme suyunda yıkanır.
5. Asit alkolde dekolore edilerek boyanın fazlası alınır.
6. Çeşme suyunda yıkanır.
7. Lityum karbonatlı suda 5 dakika bekletilir.
8. Alkolik Eosin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 1 dakika boyanır.
9. 70⁰'den başlayarak her birinde 2'şer dakika olmak üzere 80⁰ ve 96⁰'lık alkollerden ve absolut alkollerden geçirilerek eosinin fazlası alınır.
10. Ksilol kaplarında 2'şer dakika tutularak alkolden arındırılır ve şeffaflandırılır.
11. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi:

Lezyonlu ağız mukozası kısımları (dil, dudak) ve tonsillerden hazırlanan doku kesitlerinde, nekrotik-eroziv stomatitis ve nekrotik tonsillitis gözlenir. Hafif multifokal traktitis, bronşitis ve nekrotik bronşiyolit, diffuz proliferatif interstitiel pnömoni ve alveolar sinsityal hücre formasyonları görülür. Sindirim sisteminin lezyonlu bölgelerindeki epiteller ile bronş ve bronşiyol epitellerinde, tip II pnömositlerde ve sinsityal hücrelerde sitoplazmik ve nükleer eozinofilik inklüzyonlar vardır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.11_PPR.pdf
- Caswell, J.L., Williams, J.W. (2007) Respiratory System, In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Maxie, MG (ed), 5th ed., Elsevier Saunders, Edinburg, London, Newyork, Toronto, London, Sydney, Vol:2, p. 132-133, 150-152, 618.
- Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd ed., McGraw-Hill Book Company, Newyork, Toronto, London, Sydney, p. 38-39.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KOYUNLARIN PULMONER ADENOMATOZİSİ (OVINE PULMONARY ADENOMATOSIS)'NİN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Koyun ve keçilerde Pulmoner Adenomatoz (Ovine Pulmonary Adenomatosis)'un yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir. Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities” bölümü ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY \(bis\).pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_(bis).pdf)) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HE: Hematoksilen-Eosin.

OPA: Ovine Pulmonary Adenomatosis.

Koyunların Pulmoner Adenomatozisi (Ovine Pulmonary Adenomatosis): Hastalık etkeni *Retrovirus tip A/D*'dir. Viral bir enfeksiyon gibi değerlendirmekten ziyade düşük dereceli karsinomlar gibi davranan “bronşiolalveoler tümörün enfeksiyöz formu” olarak kabul edilmektedir.

Dünyada koyuncululuğun yoğun yapıldığı bölgelerde gözlenir. Klinik bulgular aylarca, yıllarca gözlenmez, ancak erişkin koyunlarda dikkati çeker. Hastalığın başlangıcındaki ana bulgular öksürük ve egzersize karşı dayanıksızlıktır. Daha sonra burunda bol miktarda sulu eksudat görülür ve buna bağlı hırıltılı solunum dikkat çeker. Burundan akan eksudat, özellikle hayvanın başı aşağıya doğru indirildiğinde artar. Bu da önemli bir bulgudur.

Nekropside saptanan en önemli lezyonlar akciğerlerdeki irili ufaklı gri- beyaz nodüllerdir. Bazen bu nodüller amfizematöz bir bandla çevrilidir. Akciğerler oldukça ağırlaşır ve iyi kollabe olmazlar, kesit yüzleri nemlidir.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Koyun ve keçilerde Pulmoner Adenomatoz'un yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için gerekli mikroskopik bulguları açıklamaktır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilen lezyonlu akciğer örnekleri, rutin doku işleme yöntemlerine göre işlenerek hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, HE ile boyanır ve ışık mikroskobunda muayene edilir. Histolojik akciğer kesitlerinde, alveol ve bronşiol epitellerinde adenomatoid lezyonların varlığı aranır.

7.1. Materyal

Lezyonlu akciğer örnekleri incelenir.

7.1.1 Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Etüv

Boyama seti/ Boyama Cihazı

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

%37-40 formalin

Sodyum fosfat monobazik

Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)

Dereceli alkoller (60°, 70°, 80°, 96°)

Absolut alkol

Ksilol

Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)

Hazır Hematoksilen-eosin boyası

Lityum karbonat

Hidroklorik asit

Entellan

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonu

%37-40 formalin	100.0 ml
Distile su	900.0 ml
Sodyum fosfat monobazik	4.0 g
Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)	6.5 g

Doymuş Lityum karbonat

Lityum karbonat	1.0 g
Distile su	100.0 ml

Asit alkol

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asit, konsantre	10.0 ml

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1.Dokuların Tespiti:

Lezyonlu akciğer örnekleri, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir.

7.2.2.Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- Tespit edilen dokular, trimlenerek kasetlere yerleştirilir.
- Çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- Dokular, Doku Takip Cihazı'nda dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir; daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 60°	(120 dakika)
Etanol 70°	(120 dakika)
Etanol 80°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol – Parafin	(120 dakika)
Parafin	(120 dakika)

- En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3.Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56°-60°lik etüvde kurutulur.

7.2.4.Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile Kapatılması:

Kesitler HE ile boyanarak üzerlerine lamel kapatılır.

Hematoksilen-Eosin Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, önce 3 adet ksilol kaplarında her birinde 5 dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. 2 adet absolut alkol kaplarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol uzaklaştırılır ve sırasıyla dereceli alkollerden (96°, 80°, 70°)geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.

2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Instant hematoksilen (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 4 dakika boyanır.
4. Çeşme suyunda yıkanır.
5. Asit alkolde dekolore edilerek boyanın fazlası alınır.
6. Çeşme suyunda yıkanır.
7. Lityum karbonatlı suda 5 dakika bekletilir.
8. Alkolik Eosin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 1 dakika boyanır.
9. 70°'den başlayarak her birinde 2'şer dakika olmak üzere 80° ve 96°'lik alkollerden ve absolut alkollerden geçirilerek eosinin fazlası alınır.
10. Ksilol kaplarında 2'şer dakika tutularak alkolden arındırılır ve şeffaflandırılır.
11. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi:

Pulmoner Adenomatöz'un karakteristik histolojik bulgusu; alveolleri döşeyen kübik ve prizmatik hücrelerin lümenlere doğru yaptığı uzantılar ve bunların oluşturduğu multiple proliferatif odaklardır. Devam eden proliferasyonun nedeni bilinmemektedir; disorganize ve dejeneratif bölgelerde genellikle fibroplazi görülür. Erken ve komplike olmamış proliferatif lezyonlarda, yangısal hücre infiltrasyonu görülmez; buna karşın alveol lümenlerinde yer yer makrofaj topluluklarına rastlanır. İntersitisyel yangının yokluğu ile prizmatik ya da kübik epitellerin papiller proliferasyonları, alveol epitel hiperplazisinin nispeten önemsiz olduğu kronik progresif pnömonide (Maedi) görülen lenfolitiküler intersitisyel pnömoniden ayrımı sağlayan önemli bir noktadır. Birçok nodülde hem alveoler hem de bronşiollerde papiller proliferasyonlar görülür.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.10_OPA.pdf
- Caswell, J.L., Williams, J.W. (2007) Respiratory System, In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Maxie, M.G. (ed), 5th ed., Elsevier Saunders, Edinburg, London, Newyork, Toronto, London, Sydney, Vol:2.
- Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd ed., McGraw-Hill Book Company, Newyork, Toronto, London, Sydney, p. 38-39.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

At
Hastalıkları



TEK TIRNAKLILARDA RUAM (GLANDERS) HASTALIĞI'NIN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Tek tırnaklılarda *Burkholderia mallei* tarafından meydana getirilen Ruam (Glanders) Hastalığı'nın yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir. Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities” bölümü ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY \(bis\).pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_bis.pdf)) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HE: Hematoksilen-Eosin.

Ruam (Glanders) Hastalığı: *Burkholderia mallei* (W.H. Burkholder: köklü bitkilerde [soğan gibi] çürümeye neden olan etkenleri [*Pseudomonas sp.*] keşfeden Amerikalı bir bakteriyolog) tarafından oluşturulan zoonoz bir enfeksiyondur. Günümüze kadar etken *Pseudomonas mallei*, *Actinobacillus mallei*, *Malleomyces mallei* ve *Leofferella mallei* gibi çeşitli isimlerle de anılmıştır. Ruam hastalığı tek tırnaklı hayvanların (at, katır) enfeksiyöz hastalığıdır. At eti yiyen karnivorlarda (aslan, kaplan, köpek, kedi) da görülebilir. Keçi ve koyunlar kontakt enfeksiyona duyarlıysa da sığır ve domuzlar duyarsızdır.

Hastalık etkeni, hasta hayvanların burun ve boğaz salgıları ya da dışkılarıyla kontamine su ve yiyeceklerle alimenter ve kısmen de aerojen alınır. Etkenle bulaşık materyalin derideki portantreler ve konjunktivadan girmesi de mümkündür.

Alınan etken orofaringeal mukozaya, bağırsaklara yerleşir. Lenf damarlarıyla bölge lenf yumrularına, sonra da hematojen yol ile iç organlara ve akciğere gelir. Bu nedenle burun ve akciğer ruamı daima sekonder oluşur. Deri ruamının şekillenmesi derideki çatlaklardan olursa genelde yüzeysel kalır, esas yayılım hematojendir.

Atlarda ruam hastalığı burun, akciğer ve deri ruamı olmak üzere 3 formda görülür. Burun ruamında, ülseratif ve nodüler pyogranümatöz lezyonlar; akciğer ruamında eksudatif ve produktif (nodüler pyogranümatöz) lezyonlar; deri ruamında ise ülseratif dermatitis ve/veya nodüler lenfangitis

şekillenir.

Burun ruamında mukoza hiperemiktir. Submukozada pyogranulomatöz lezyonlar görülür. İrinli nekrotik nodülcüklerle başlar; ülser, granülasyon dokusu ve nedbeleşmeyle sonuçlanır. Propria mukozada damarların tromboza uğraması ve lökosit infiltrasyonu ödem sonucu mukoza kabarır. Mukozada tek veya multiple; submilir veya milier, bulanık sarımtırak boz renkte çevresi hiperemik halkayla kuşatılmış nodülcükler gelişir. Nodüllerin merkezi irinleşerek erir, üzerindeki mukoza nekroze olup dökülür. Dipleri düz, kenarları dik inen, zımba ile delinmiş gibi primer ruam ülserleri (lentiküler ülserler) şekillenir. Primer ülserlerin birleşmesiyle kenarları kabarık, tabanı granülasyon dokusundan yapılmış sekonder ülserler (kemirilmiş gibi rodent ülserler) oluşur. Septum nazide de perforasyon şekillenir.

Akciğer ruamı, etkenin virulansı ve organizmanın reaksiyonuna göre akut veya kronik seyreder. Morfolojik görünümüne göre eksudatif veya produktif (granulomatöz) olur.

Deri ruamında, deri altı lenf damarların kordon halinde kalınlaşma ve bunların üzerlerine rastlayan lenf damarları uzamınca tesbih tanesi gibi dizilmiş nodüller şekillenir. Bunların ortası nekroza olup irinleşir ve deri yüzeyine açılmasıyla kenarları kalkık ülserler gelişir. İçlerinden zeytinyağı görünüşü ve kıvamında "*Huile de Farcin*" denilen eksudat gelir. Çevredeki deri altı bağ dokusunda da flegmon oluşur (*Malleus Flegmonu*). İlerlemiş durumda bu bölgelerde ödem sonu bağ dokusu artışı olur ve *Elephantiasis Malleosa* şekillenir.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Tek tırnaklılarda Ruam (Glanders) Hastalığı'nın yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için gerekli mikroskopik bulguları açıklamaktır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

Üst solunum yolları mukozası (burun, larinks, trakea), akciğer, deri ve lenf düğümü örnekleri, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir. Tespit edilen örnekler, daha sonra rutin doku işleme yöntemlerine göre işlenir ve hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, Hematoksilen-Eosin (HE) boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda muayene edilir. Histolojik doku kesitlerinde; kireçlenme gösterebilen pyogranulomatöz nodül ve ülserler ile karakterize lezyonların varlığı aranır.

7.1. Materyal

Üst solunum yolları mukozası (burun, larinks, trakea), akciğer, deri ve lenf düğümü örnekleri incelenir.

7.1.1. Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Etüv

Boyama seti

Boyama Cihazı

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

%37-40 formaldehid

Sodyum fosfat monobasic
Sodyum fosfat dibasik (anhidroz)
Dereceli alkoller (60°, 70°, 80°, 96°)
Absolut alkol
Ksilol
Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)
Hazır Hematoksilen-eosin boyası
Lityum karbonat
Hidroklorik asid
Entellan

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonu

%37-40 formalin	100.0 ml
Distile su	900.0 ml
Sodyum fosfat monobasic	4.0 g
Sodyum fosfat dibasik (anhidroz)	6.5 g

Doymuş Lityum karbonat

Lityum karbonat	1.0 g
Distile su	100.0 ml

Asit alkol

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asid, konsantre	10.0 ml

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1.Dokuların Tespiti:

Doku örnekleri, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir.

7.2.2.Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- Tespit edilen dokular, trimlenerek kasetlere yerleştirilir.
- Çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- Dokular, Doku Takip Cihazı'nda dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir; daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 60°	(120 dakika)
Etanol 70°	(120 dakika)
Etanol 80°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol – Parafin	(120 dakika)
Parafin	(120 dakika)

- En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3.Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56°-60°lik etüvde kurutulur.

7.2.4.Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile Kapatılması:

Daha sonra kesitler Hematoksilen-Eosin ile boyanarak üzerlerine lamel kapatılır.

Hematoksilen-Eosin Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, önce 3 adet ksilol kaplarında her birinde 5 dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. İki adet absolut alkol kaplarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol uzaklaştırılır ve sırasıyla dereceli alkollerden (96°, 80°, 70°) geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.
2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Instant hematoksilen (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 4 dakika boyanır.
4. Çeşme suyunda yıkanır.
5. Asit alkolde dekolore edilerek boyanın fazlası alınır.
6. Çeşme suyunda yıkanır.
7. Lityum karbonatlı suda 5 dakika bekletilir.
8. Alkolik Eosin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 1 dakika boyanır.
9. 70°den başlayarak her birinde 2'şer dakika olmak üzere 80° ve 96°lik alkollerden ve absolut alkollerden geçirilerek eosinin fazlası alınır.
10. Ksilol kaplarında 2'şer dakika tutularak alkolden arındırılır ve şeffaflandırılır.
11. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi:

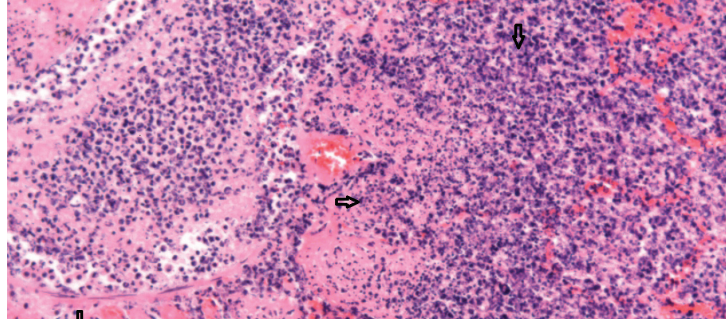
Burun mukozasına etken sekonder yoldan geldiğinden ilk mikroskopik bulgu damarlardaki hiperemi ve yangılı tromboz şekillenmesidir. Damar çevresindeki dokuda yoğun nötrofil lökosit infiltrasyonu ve kanamalar bulunur. Nötrofil lökositlerin çoğunun çekirdekleri parçalanmıştır, karyoreksise (Karyorrhesis) uğramıştır. Karyoreksis ruam hastalığının teşhisi için karakteristik bir bulgu olarak kabul edilir.

Akciğerlerde produktif tipte, nodüller görülür (Resim 1). Nodüllerin ortasında karyorektik nötrofil lökositlerin yer aldığı nekroz sahası; çevresinde aralarına lenfositlerin de serpiştiği makrofaj, epitelioid histiyosit ve dev hücreleri; en dışta da fibrosit ve fibroblastlardan (bağ dokudan) oluşan kapsül bulunur. Eski nodüllerin ortası kireçlenir. Dev hücresi azdır, çoğunlukla görülmez. Eksudatif tipte ise purulent bronkopnömoni ile karşılaşılır (Resim 2). Dokuda nekroz sonucu erimeler, kavernler görülür. Alveollerin içinde karyoreksise uğramış nötrofil lökositleri içeren eksudat bulunur.

Deride, ülser ve nodüllerin yanısıra lenf damarlarında trombotik-purulent lenfangitis malleosa, çevrede ödem, flegmon ve olay kronikleştiğinde bağ dokusu artışı vardır.



Resim 1. Produktif tipte nodüler görünüm, Karyoreksise uğramış nötrofil lökositler, Ruam hastalığı, Akciğer, HE, x100 (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Arşivi).



Resim 2. Alveollerde ödem ve karyoreksise uğramış nötrofil lökositler (oklar), Eksudatif tipte ruam hastalığı, HE, x100 (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Arşivi).

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE (2012). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.11_GLANDERS.pdf
- Caswell, J.L., Williams, J.W. (2007) Respiratory System, In : Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Maxie, M.G. (ed), 5th ed., Elsevier Saunders, Edinburg, London, Newyork, Toronto, London, Sydney, Vol:2, p. 633-634.
- Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forced Institute of Pathology, 3rd ed., McGraw-Hill Book Company, Newyork, Toronto, London, Sydney, p. 38-39.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KISRAK VİRAL ABORTUSU (EQUINE RHINOPNEUMONITIS)'N HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Atık fütüslerde ve sinirsel semptom gösteren atlarda Rhinopneumonitis (Equine Rhinopneumonitis) hastalığının yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir. Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities” bölümü ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_\(bis\).pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_(bis).pdf)) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HE: Hematoksilen-Eosin.

Kısrakların Viral Abortusu: *Equine herpesvirus (EHV)* tarafından oluşturulan, yeni doğan taylarda ve yarış atlarında (*EHV-4*) hafif solunum yolu enfeksiyonu ile kısraklarda (*EHV-1*) abortusla karakterize bir enfeksiyondur. *EHV-4* ile enfeksiyonlar yeni doğan taylarda sonbaharda görülür. Aerogen enfeksiyonla alınan etken üst solunum yollarından vücuda girer. Gebelerde plasenta üzerinden yavruya geçer .

Hafif ateş, seröz veya kataral rinitis ve konjunktivitis ile karakterizedir. Nadiren ishal ve eklemlerde ödem görülür. Hastalığın solunum şekli geçicidir. Burun mukozası ve akciğerlerde virusun oluşturduğu primer lezyonlar nekropside nadiren görülür. Ancak sekonder bakteriyel komplikasyonlar varsa rinitis, faringitis ve bronkopnömoni şekillenebilir.

Özellikle yetişkinlerde beyinde nekrotik vaskülitis sonucu gelişen hipoksi ve işemiye ilgili malasi; dissemine meningoensefalitis nedeniyle klinikte ataksi görülür.

Gebelerde (7-10 aylarda) abortus ile karakteristiktir. Esas bulgular atılan fütustadır. Fötüs ikteriktir, mukozalarda peteşiyel kanamalar, subkutan ödem görülebilir. Ancak organlardan özellikle karaciğer ve dalakta fokal nekroz, pnömoni ve intranükleer inklüzyon cisimcikleri görülür.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Atık fütüslerde ve sinirsel semptom gösteren atlarda Rhinopnömonitis hastalığının yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için gerekli mikroskobik bulguları açıklamaktır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilen atık fütüs dokuları veya sinirsel bulgu göstererek ölen atların beyin ve medulla spinalisi, rutin doku işleme yöntemlerine göre işlenerek hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, HE boyası ile boyanarak ışık mikroskobunda muayene edilir. Doku kesitlerinde, atık fütüse ait organ örneklerinde milier-submilier nekroz odakları çevresindeki hücrelerde asidofilik intranükleer inklüzyon cisimcikleri; sinirsel bulgu göstererek ölen atların beyin ve medulla spinalisinde nekrotik vaskülit ve bunun sonucunda gelişen hipoksi ve iskemiye ilgili malasi; dissemine meningoensefalitis aranır.

7.1. Materyal

Atık fütüs dokuları ve sinirsel bulgu göstererek ölen atlardan alınan beyin ve medulla spinalis örnekleri incelenir.

7.1.1 Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Etüv

Boyama seti/ Boyama Cihazı

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

%37-40'luk formalin

Dereceli alkoller (60°, 70°, 80°, 96°)

Absolut alkol

Ksilol

Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)

Hazır Hematoksilen-eosin boyası

Lityum karbonat

Hidroklorik asit, konsantre

Entellan

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonu

%37-40 formalin	100.0 ml
Distile su	900.0 ml
Sodyum fosfat monobazik	4.0 g
Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)	6.5 g

Doymuş Lityum karbonatlı su

Lityum karbonat	1.0 g
Distile su	100.0 ml

Asit alkol

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asit, konsantre	10.0 ml

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1.Dokuların Tespiti:

Atık fötüs dokuları ve sinirsel bulgu göstererek ölen atların beyin ve medulla spinalis dokuları %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir.

7.2.2.Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- Tespit edilen dokular, trimlenerek kasetlere yerleştirilir.
- Çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- Dokular, Doku Takip Cihazı'nda dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir; daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 60°	(120 dakika)
Etanol 70°	(120 dakika)
Etanol 80°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol – Parafin	(120 dakika)
Parafin	(120 dakika)

- En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3.Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56°-60°'lik etüvde kurutulur.

7.2.4.Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile Kapatılması:

Kesitler HE ile boyanarak üzerlerine lamel kapatılır.

Hematoksilen-Eosin Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, önce 3 adet ksilol kaplarında her birinde 5 dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. 2 adet absolut alkol kaplarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol uzaklaştırılır

ve sırasıyla dereceli alkollerden (96⁰, 80⁰, 70⁰) geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.

2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Instant hematoksilen (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 4 dakika boyanır.
4. Çeşme suyunda yıkanır.
5. Asit alkolde dekolore edilerek boyanın fazlası alınır.
6. Çeşme suyunda yıkanır.
7. Lityum karbonatlı suda 5 dakika bekletilir.
8. Alkolik Eosin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 1 dakika boyanır.
9. 70⁰'den başlayarak her birinde 2'şer dakika olmak üzere 80⁰ ve 96⁰'lik alkollerden ve absolut alkollerden geçirilerek eosinin fazlası alınır.
10. Ksilol kaplarında 2'şer dakika tutularak alkolden arındırılır ve şeffaflandırılır.
11. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi:

HE ile boyanan doku kesitlerinde; atık fütüse ait akciğer, karaciğer, dalak ve lenf düğümlerinde milier-submilier nekroz odakları görülür. Akciğerde bronş, bronşiol ve alveol epitellerinde, karaciğerde hepatositlerde, dalak ve lenf düğümlerinde EHV-1 için patognomonik asidofilik intranükleer inklüzyon cisimcikleri dikkati çeker. Sinirsel bulgu göstererek ölen atların beyin ve medulla spinalisinde küçük kan damarlarında nekrotik vaskülitis ile dissemine meningoensefalitise ilgili bulgular (mononükleer yangısal hücre infiltrasyonu, perivasküler kuffing, gliosis) saptanır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.09_EQUINE_RHINO.pdf
- Schlafer, D.H., Miller, R.B. (2007) Female Genital System, In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Maxie, M.G. (ed), 5th ed., Elsevier Saunders, Edinburg, London, Newyork, Toronto, London, Sydney, Vol:3, p. 532-534.
- Caswell, J.L., Williams, J.W. (2007) Respiratory System, In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Maxie, M.G. (ed), 5th ed., Elsevier Saunders, Edinburg, London, Newyork, Toronto, London, Sydney, Vol:2, p. 549, 629.
- Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forced Institute of Pathology, 3rd ed., McGraw-Hill Book Company, Newyork, Toronto, London, Sydney, p. 38-39.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

EQUINE VİRAL ARTERİTİS'İN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Başta atlar olmak üzere tek tırnaklılarda Viral Arteritis (EVA) hastalığının yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir. Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities” bölümü ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_\(bis\).pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_(bis).pdf)) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

EVA: Equine Viral Arteritis

HE: Hematoksilin-Eosin

Equine Viral Arteritis: *Togoviridae* familyasına ait *Arteriviruslar* tarafından atlarda görülen viral bir hastalıktır.

Virus, enfeksiyonun akut evresinde solunum ve venereal yolla bulaşır. Venereal yolla enfekte olan kısıraklar bağışık olmayan kısırakları aerosol yolla enfekte edebilirler. Virus damarların endotel hücrelerine affinite gösterir.

Klinik olarak bacaklarda ve gövdenin ventral bölümlerinde ödem, mukopurulent göz ve burun akıntısı rhinitis ve konjunktivitis görülür. Deride erupsiyonlar, gebe hayvanlarda ise abort şekillenir. Bu bulgulara ek olarak makroskopik incelemede, tüm serozalarda, mide ve akciğerlerde kanamalar; plöra ve peritoneal boşlukta fibrinli bir eksudat dikkati çeker. Özellikle kalın bağırsaklarda daha şiddetli olmak üzere hemorajik ve difteroid tabiatla enteritis şekillenir.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Tek tırnaklılarda Viral Arteritis (EVA) hastalığının yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için gerekli mikroskopik bulguları açıklamaktır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilen dokular rutin doku işleme yöntemlerine göre işlenerek hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, HE ile boyanarak ışık mikroskopunda muayene edilir. Virus endotel hücreleri için patojenik olup damarlarda (özellikle sekum, kolon, dalak, bölgesel lenf yumruları ve adrenal korteksteki) panvaskülitise neden olur.

7.1. Materyal

Hastalıktan şüpheli olgularda ilgili organlardan (özellikle sekum, kolon, dalak, ilişkili lenf yumruları ve adrenal korteks) alınan örnekler incelenir.

7.1.1 Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Etüv

Boyama seti/ Boyama Cihazı

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

%37-40'luk formalin

Dereceli alkoller (60°, 70°, 80°, 96°)

Absolut alkol

Ksilol

Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)

Hazır Hematoksilen-Eosin boyası

Lityum karbonat

Hidroklorik asit, konsantre

Entellan

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonu

%37-40 formalin	100.0 ml
Distile su	900.0 ml
Sodyum fosfat monobazik	4.0 g
Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)	6.5 g

Doymuş Lityum karbonatlı su

Lityum karbonat	1.0 g
Distile su	100.0 ml

Asit alkol

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asit, konsantre	10.0 ml

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1.Dokuların Tespiti:

Alınan dokular %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir.

7.2.2. Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- Tespit edilen dokular, trimlenerek kasetlere yerleştirilir.
- Çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- Dokular, Doku Takip Cihazı'nda dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir; daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 60°	(120 dakika)
Etanol 70°	(120 dakika)
Etanol 80°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol – Parafin	(120 dakika)
Parafin	(120 dakika)

- En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3. Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56°-60°lik etüvde kurutulur.

7.2.4.Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile Kapatılması:

Kesitler HE ile boyanarak üzerlerine lamel kapatılır.

Hematoksilen-Eosin Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, önce 3 adet ksilol kaplarında her birinde 5 dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. 2 adet absolut alkol kaplarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol uzaklaştırılır ve sırasıyla dereceli alkollerden (96°, 80°, 70°) geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.
2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Instant hematoksislen (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 4 dakika boyanır.
4. Çeşme suyunda yıkanır.
5. Asit alkolde dekolore edilerek boyanın fazlası alınır.
6. Çeşme suyunda yıkanır.
7. Lityum karbonatlı suda 5 dakika bekletilir.
8. Alkolik Eosin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 1 dakika boyanır.
9. 70°'den başlayarak her birinde 2'şer dakika olmak üzere 80° ve 96°'lik alkollerden ve absolut alkollerden geçirilerek eosinin fazlası alınır.
10. Ksilol kaplarında 2'şer dakika tutularak alkolden arındırılır ve şeffaflandırılır.
11. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi :

Histopatolojik incelemede doku kesitlerinde, panvaskulitis görülür. Damarların endotel ve media tabakasındaki hücrelerde fokal ya da segmental nekrozların görülmesi EVA için patognomoniktir. Ayrıca damar duvarında ödemle beraber yangısal hücre infiltrasyonu dikkate çeker.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.10_EVA.pdf
- Schlafer, D.H., Miller, R.B. (2007) Female Genital System, In : Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Maxie, MG (ed), 5.th edition, Elsevier Saunders, Edinburg, London, Newyork, Toronto, London, Sydney, Vol:3, p.522-523.
- Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forced Institute of Pathology, 3.rd edition, McGraw-Hill Book Company, Newyork, Toronto, London, Sydney, p. 38-39.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

**Kanatlı
Hastalıkları**



KANATLI ÇİÇEK (FOWL POX) HASTALIĞI'NIN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Kanatlılarda Çiçek (Fowl Pox) Hastalığı'nın yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir. Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities" bölümü ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY \(bis\).pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_(bis).pdf)) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HE: Hematoksilen-Eosin.

Kanatlı Çiçek Hastalığı: Etken, *Chordopoxvirinae* alt familyasında yer alan cinslerden *Avipoxvirus*'dur. Deri, mukoza, burun boşluğu ve larinkste difteroid yangılar görülmektedir. Deri formunda, öncelikle tüysüz deri bölgelerinde (ibik, sakal, kloaka) çok sayıda yassı, birbirleri ile kısmen birleşen, bezelye büyüklüğüne varabilen, üzerleri düz veya siğilimsi biçimde düğümçükler oluşur. Bunlar bir süre sonra kirli sarımsak renkte kuru bir eksudat ile (kabuklaşma) örtülür.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Kanatlılarda Çiçek Hastalığı'nın yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için gerekli mikroskopik bulguları açıklamaktır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

Hastalıktan şüpheli kanatlılardan alınan ve %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilen lezyonlu deri kısımları, difterik formda ağız mukozası, özefagus, larinks veya trakea örnekleri, rutin doku işleme yöntemlerine göre işlenerek hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, HE ile boyanır ve ışık mikroskopunda muayene edilir. Doku kesitlerinde, deri ve ağız mukozasında proliferatif lezyonlar ve epitel hücrelerinde patognomonik intrasitoplazmik inklüzyonlar ile karakteristik histopatolojik bulguların varlığı aranır.

7.1. Materyal

Lezyonlu deri kısımları, ağız mukozası, özefagus, larinks ve soluk borusu örnekleri incelenir.

7.1.1 Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Etüv

Boyama seti / Boyama Cihazı

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

%37-40'lık formalin

Dereceli alkoller (60°, 70°, 80°, 96°)

Absolut alkol

Ksilol

Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)

Hazır Hematoksilen-eosin boyası

Lityum karbonat

Hidroklorik asit, konsantre

Entellan

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonu

%37-40 formalin	100.0 ml
Distile su	900.0 ml
Sodyum fosfat monobazik	4.0 g
Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)	6.5 g

Doymuş Lityum karbonatlı su

Lityum karbonat	1.0 g
Distile su	100.0 ml

Asit alkol

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asit, konsantre	10.0 ml

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1. Dokuların Tespiti:

Lezyonlu deri kısımları, ağız mukozası, özefagus, larinks ve soluk borusu örnekleri, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir.

7.2.2. Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- Tespit edilen dokular, trimlenerek kasetlere yerleştirilir.
- Çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- Dokular, Doku Takip Cihazı'nda dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir; daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 60 ⁰	(120 dakika)
Etanol 70 ⁰	(120 dakika)
Etanol 80 ⁰	(120 dakika)
Etanol 96 ⁰	(120 dakika)
Etanol 96 ⁰	(120 dakika)
Absolut etanol 100 ⁰	(120 dakika)
Absolut etanol 100 ⁰	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol – Parafin	(120 dakika)
Parafin	(120 dakika)

- En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3. Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56⁰-60⁰'lik etüvde kurutulur

7.2.4. Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile Kapatılması:

Kesitler HE ile boyanarak üzerlerine lamel kapatılır.

Hematoksilen-Eosin Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, önce 3 adet ksilol kaplarında her birinde 5 dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. İki adet absolut alkol kaplarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol uzaklaştırılır ve sırasıyla dereceli alkollerden (96⁰, 80⁰, 70⁰) geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.
2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Instant hematoksilin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 4 dakika boyanır.
4. Çeşme suyunda yıkanır.

5. Asit alkolde dekolore edilerek boyanın fazlası alınır.
6. Çeşme suyunda yıkanır.
7. Lityum karbonatlı suda 5 dakika bekletilir.
8. Alkolik Eosin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 1 dakika boyanır.
9. 70°den başlayarak her birinde 2'şer dakika olmak üzere 80° ve 96°'lik alkollerden ve absolut alkollerden geçirilerek eosinin fazlası alınır.
10. Ksilol kaplarında 2'şer dakika tutularak alkolden temizlenir ve şeffaflandırılır.
11. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi:

Histopatolojik olarak; epidermis hücrelerinde tipik balonumsu dejenerasyon vardır. Bu hücrelerin sitoplazmalarında yağ boyalarıyla kolayca ortaya konabilen *Bollinger inkluzyon* cisimcikleri bulunur.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.10_FOWLPOX.pdf
- Hofstad, M.S., Barnes, H.J., Calnek, B.W., Reid, W.M., Yoder, H.W. (1984) Diseases of Poultry, 8th ed., Iowa State Press, Ames, Iowa, p. 524-534.
- Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd ed., McGraw-Hill Book Company, Newyork, Toronto, London, Sydney, p. 38-39.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

GUMBORO HASTALIĞI (INFECTIOUS BURSAL DISEASE)'NIN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Kanatlılarda başta tavuklarda Gumboro Hastalığı (Infectious Bursal Disease)'nın yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir. Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities” bölümü ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY \(bis\).pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_bis.pdf)) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

IBD: Infectious bursal disease

HE: Hematoksilen-Eosin.

Gumboro Hastalığı (Infectious Bursal Disease): Hastalığın spesifik etkeni, *Birnaviridae* ailesine bağlı *Infectious Bursal Disease Virus (IBDV)*'udur. Tavukların, sıklıkla civciv ve piliçlerin bulaşıcı, bursa Fabricius gibi primer lenfoid organda bozukluklar yaparak immun sistemin baskılanmasına yol açan viral bir hastalıktır. Hastalık en çok sindirim yolu ile bulaşır. Ancak ağız, göz ve kloaka ile bulaşma vardır. En çok 3-6 haftalık tavuklar duyarlıdır.

Makroskobik olarak, bacak ve göğüs kısımlarında, pektoral ve kalp kasında kanamalar, hastalığın seyrine göre bursa Fabricius'ta ödem, hemoraji ve nekrotik alanlar dikkati çeker. Bursa Fabricius atrofikdir. Dalakta gri renkte uniform alanlar bulunmaktadır.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Kanatlılarda Gumboro Hastalığı'nın yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için gerekli mikroskobik bulguları açıklamaktır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

Hastalıktan şüpheli kanatlılardan alınan ve %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilen bursa Fabricius örnekleri, rutin doku işleme yöntemlerine göre işlenerek hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, HE ile boyanır ve ışık mikroskobunda muayene edilir. Doku kesitlerinde karakteristik histopatolojik bulguların varlığı aranır.

7.1. Materyal

Hastalıktan şüpheli tavuklardan alınan bursa Fabricius örnekleri incelenir.

7.1.1 Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Etüv

Boyama seti/ Boyama Cihazı

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

%37-40'luk formalin

Dereceli alkoller (60°, 70°, 80°, 96°)

Absolut alkol

Ksilol

Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)

Hazır Hematoksilen-eosin boyası

Lityum karbonat

Hidroklorik asit, konsantre

Entellan

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonu

%37-40 formalin	100.0 ml
Distile su	900.0 ml
Sodyum fosfat monobazik	4.0 g
Sodyum fosfat dibazik (anhidröz)	6.5 g

Doymuş Lityum karbonatlı su

Lityum karbonat	1.0 g
Distile su	100.0 ml

Asit alkol

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asit, konsantre	10.0 ml

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1. Dokuların Tespiti:

Bursa Fabricius örnekleri, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir.

7.2.2. Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- Tespit edilen dokular, trimlenerek kasetlere yerleştirilir.
- Çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- Dokular, Doku Takip Cihazı'nda dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir; daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 60 ⁰	(120 dakika)
Etanol 70 ⁰	(120 dakika)
Etanol 80 ⁰	(120 dakika)
Etanol 96 ⁰	(120 dakika)
Etanol 96 ⁰	(120 dakika)
Absolut etanol 100 ⁰	(120 dakika)
Absolut etanol 100 ⁰	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol – Parafin	(120 dakika)
Parafin	(120 dakika)

- En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3. Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56⁰-60⁰'lik etüvde kurutulur.

7.2.4. Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile Kapatılması:

Kesitler HE ile boyanarak üzerlerine lamel kapatılır.

Hematoksilen-Eosin Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, önce 3 adet ksilol kaplarında her birinde 5 dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. 2 adet absolut alkol kaplarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol uzaklaştırılır ve sırasıyla dereceli alkollerden (96⁰, 80⁰, 70⁰) geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.
2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Instant hematoxilen (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 4 dakika boyanır.
4. Çeşme suyunda yıkanır.

5. Asit alkolde dekolore edilerek boyanın fazlası alınır.
6. Çeşme suyunda yıkanır.
7. Lityum karbonatlı suda 5 dakika bekletilir.
8. Alkolik Eosin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 1 dakika boyanır.
9. 70°den başlayarak her birinde 2'şer dakika olmak üzere 80° ve 96°'lik alkollerden ve absolut alkollerden geçirilerek eosinin fazlası alınır.
10. Ksilol kaplarında 2'şer dakika tutularak alkolden arındırılır ve şeffaflandırılır.
11. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi :

Histopatolojik olarak, bursal foliküllerin merkezinde dejenere ve nekrotik lenfositler vardır. İntrafolliküler heterofil infiltrasyonu ve kist oluşumları, interfoliküler alanda plazma hücreleri ve makrofajlarla kronik olgularda fibröz bağ doku göze çarpar.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- ☐ OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.12_IBD.pdf
- ☐ Etteradossi, N., Saif, Y.M. (2008) Infectious Bursal Disease. In: Saif, Y.M., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Swayne, D.E. Diseases of Poultry, 12th ed., p. 185-208.
- ☐ Shane, S.M. (2005) Handbook on Poultry Disease, 2nd ed., p. 72-75.
- ☐ Hofstad, M.S., Barnes, H.J., Calnek, B.W., Reid, W.M., Yoder, H.W. (1984) Diseases of Poultry, 8th ed., Iowa State Press, Ames, Iowa, p. 566-575.
- ☐ Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd ed., McGraw-Hill Book Company, Newyork, Toronto, London, Sydney, p. 38-39.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KANATLILARIN INFECTIOUS LARINGOTRACHEITIS HASTALIĞI'NIN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Kanatlılarda başta tavuklarda Infectious Laringotracheitis (ILT) Hastalığı'nın yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir. Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities" bölümü ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_\(bis\).pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_(bis).pdf)) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

ILT: Infectious Laringotracheitis

HE: Hematoksilen-Eosin.

Infectious Laringotracheitis Hastalığı: Etken *Herpesvirüs*'dür. Birçok ülkede, önemli bir hastalık olup daha dar alanda çok kalabalık sürülerde görülmektedir. Direkt olarak üst solunum yolu ve göz yoluyla etken alınmaktadır. Mekanik bulaşma daha çok kullanılan kümes malzemelerinden olmaktadır.

Laryngotracheitis akut olarak solunum yolu hastalarına neden olmaktadır. Burun mukozasının ve konjunktivanın kataral bir yangısı ile başlar. Daha sonraları, larinks ve trakea'nın üst kısımlarının mukozasında ödem, kanamalar ve fibrinöz değişiklikler meydana gelir.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Kanatlılarda Infectious Laringotracheitis Hastalığı'nın yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için gerekli mikroskopik bulguları açıklamaktır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

Hastalıktan şüpheli kanatlılardan alınan ve %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilen larinks ve trakea örnekleri, rutin doku işleme yöntemlerine göre işlenerek hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, HE ile boyanır ve ışık mikroskobunda muayene edilir.

Doku kesitlerinde, trakea ve larinks mukoza ve submukozasında mononükleer yangısal hücre infiltrasyonu ile Cowdry tip A inklüzyon cisimcikleri aranır.

7.1. Materyal

Hastalıktan şüpheli kanatlılardan alınan trakea ve larinks örnekleridir.

7.1.1 Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Etüv

Boyama seti/ Boyama Cihazı

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

%37-40'luk formalin

Dereceli alkoller (60°, 70°, 80°, 96°)

Absolut alkol

Ksilol

Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)

Hazır Hematoksilen-eosin boyası

Lityum karbonat

Hidroklorik asit, konsantre

Entellan

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonu

%37-40 formalin	100.0 ml
Distile su	900.0 ml
Sodyum fosfat monobazik	4.0 g
Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)	6.5 g

Doymuş Lityum karbonatlı su

Lityum karbonat	1.0 g
Distile su	100.0 ml

Asit alkol

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asit, konsantre	10.0 ml

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1. Dokuların Tespiti:

Trakea ve larinks örnekleri, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir.

7.2.2. Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- Tespit edilen dokular, trimlenerek kasetlere yerleştirilir.
- Çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- Dokular, Doku Takip Cihazı'nda dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir; daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 60°	(120 dakika)
Etanol 70°	(120 dakika)
Etanol 80°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol – Parafin	(120 dakika)
Parafin	(120 dakika)

- En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3. Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56°-60°'lik etüvde kurutulur.

7.2.4. Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile Kapatılması:

Kesitler HE ile boyanarak üzerlerine lamel kapatılır.

Hematoksilen-Eosin Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, önce 3 adet ksilol kaplarında her birinde 5 dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. 2 adet absolut alkol kaplarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol uzaklaştırılır ve sırasıyla dereceli alkollerden (96°, 80°, 70°) geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.

2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Instant hematoksilen (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 4 dakika boyanır.
4. Çeşme suyunda yıkanır.
5. Asit alkolde dekolore edilerek boyanın fazlası alınır.
6. Çeşme suyunda yıkanır.
7. Lityum karbonatlı suda 5 dakika bekletilir.
8. Alkolik Eosin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 1 dakika boyanır.
9. 70⁰'den başlayarak her birinde 2'şer dakika olmak üzere 80⁰ ve 96⁰'lık alkollerden ve absolut alkollerden geçirilerek eosinin fazlası alınır.
10. Ksilol kaplarında 2'şer dakika tutularak alkolden arındırılır ve şeffaflandırılır.
11. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi:

Histopatolojik olarak larinks ve trakea kesitlerinde, epitel hücrelerinde silyum kaybı, mukoza ve submukozada lenfosit, makrofaj ve plazma hücre infiltrasyonları, kanamalar ve epitel hücrelerinde Cowdry tip A intranükleer inklüzyonlar (enfeksiyonun 3-5 gün içinde) görülür.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE (2012). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.03_AVIAN_INF_LARYNGO.pdf
- Guy, J.S., Garcia, M. (2008) Laryngotracheitis. In: Saif, Y.M., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Swayne, D.E. Diseases of Poultry, 12th ed., p. 137-152.
- Shane, S.M. (2005) Handbook on Poultry Disease, 2nd ed., p. 84-86.
- Hofstad, M.S., Barnes, H.J., Calnek, B.W., Reid, W.M., Yoder, H.W. (1984) Diseases of Poultry, 8th ed., Iowa State Press, Ames, Iowa, p. 444-450.
- Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd ed., McGraw-Hill Book Company, Newyork, Toronto, London, Sydney, p. 38-39.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KANATLI TÜBERKULOZU (AVIAN TUBERCULOSIS)'NUN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Kanatlılarda Tuberculosis hastalığının yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir. Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities” bölümü (http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_bis.pdf) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HE : Hematoksilen-Eosin.

ZN: Ziehl-Neelsen

Kanatlı Tüberkülozu: Hastalık etkeni *Mycobacterium avium*'dur. Kronik bir hastalıktır. Sürü bazında mortalite ve morbidite yüksek olup yumurta verimi düşmekte ve sonunda ölüm gerçekleşmektedir. Hastalıklı hayvanlar, kontamine çevre, toprak ve altlık bulaşmada büyük rol oynamaktadır.

Klinik semptomlar patognomik değildir. Fakat depresyon, halsizlik, kilo kaybı, göğüs kaslarında atrofi görülmektedir.

Makroskobik olarak daha çok, karaciğer, dalak, bağırsak ve kemik iliğinde düzensiz grimsi sarımsı nodüller görülmektedir.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Kanatlılarda Tüberküloz'un yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için gerekli mikroskobik bulguları açıklamaktır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

Hastalıktan şüpheli kanatlılardan alınan ve %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilen iç organ örnekleri rutin doku işleme yöntemlerine göre işlenerek hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, HE ve ZN ile boyanır; ışık mikroskobunda değerlendirilir. Granümatöz lezyonlar ile karakteristik histopatolojik bulguların varlığı aranır.

7.1. Materyal

Hastalıktan şüpheli kanatlılardan alınan iç organ örnekleri incelenir.

7.1.1. Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Etüv

Boyama seti/ Boyama Cihazı

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

%37-40'luk formalin

Dereceli alkoller (60°, 70°, 80°, 96°)

Absolut alkol

Ksilol

Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)

Hazır Hematoksilen-Eosin boyası

Lityum karbonat

Hidroklorik asit, konsantre

Entellan

Fenol kristal

Bazik fuksin

Sülfürik asit

Metilen mavisi

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonu

%37-40 formalin	100.0 ml
Distile su	900.0 ml
Sodyum fosfat monobazik	4.0 g
Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)	6.5 g

Doymuş Lityum karbonatlı su

Lityum karbonat	1.0 g
Distile su	100.0 ml

Asit alkol

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asit, konsantre	10.0 ml

Carbol fuksin solüsyonu

Fenol kristal (çözölmüş)	2.5 ml.
Alkol, %100	5.0 ml.
Bazik fuksin	0.5 gr.
Distile su	50.0 ml.

Kullanımdan önce filtre edilir.

%1 Sülfürik asit solüsyonu

Sülfürik asit, konsantre	1.0 ml
Distile su	100.0 ml

Metilen mavisi solüsyonu (stok)

Metilen mavisi	1.4 g
Alkol, %96	100.0 ml

Metilen mavisi solüsyonu (çalışma)

Metilen mavisi solüsyonu (stok)	10.0 ml
Çeşme suyu	90.0 ml

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1. Dokuların Tespiti:

Lezyonlu doku örnekleri, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir.

7.2.2. Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- Tespit edilen dokular, trimlenerek kasetlere yerleştirilir.
- Çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- Dokular, Doku Takip Cihazı'nda dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir; daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 60° (120 dakika)

Etanol 70° (120 dakika)

Etanol 80 ⁰	(120 dakika)
Etanol 96 ⁰	(120 dakika)
Etanol 96 ⁰	(120 dakika)
Absolut etanol 100 ⁰	(120 dakika)
Absolut etanol 100 ⁰	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol – Parafin	(120 dakika)
Parafin	(120 dakika)

- En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3. Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56⁰-60⁰'lik etüvde kurutulur.

7.2.4. Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile Kapatılması:

Kesitler HE ile boyanarak üzerlerine lamel kapatılır.

Hematoksilen-Eosin Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, önce 3 adet ksilol kaplarında her birinde 5 dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. 2 adet absolut alkol kaplarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol uzaklaştırılır ve sırasıyla dereceli alkollerden (96⁰, 80⁰, 70⁰) geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.
2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Instant hematoxilen (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 4 dakika boyanır.
4. Çeşme suyunda yıkanır.
5. Asit alkolde dekolore edilerek boyanın fazlası alınır.
6. Çeşme suyunda yıkanır.
7. Lityum karbonatlı suda 5 dakika bekletilir.
8. Alkolik Eosin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 1 dakika boyanır.
9. 70⁰'den başlayarak her birinde 2'şer dakika olmak üzere 80⁰ ve 96⁰'lik alkollerden ve absolut alkollerden geçirilerek eosinin fazlası alınır.
10. Ksilol kaplarında 2'şer dakika tutularak alkolden arındırılır ve şeffaflandırılır.
11. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

Doku kesitlerinde Ziehl-Neelsen Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, distile suya kadar ksilol ve dereceli alkol serilerinden geçirilerek parafinden arındırılır ve dehidre edilir.
2. Karbol fuksin solüsyonunda 30 dakika boyanır.
3. Çeşme suyunda iyice yıkanır.
4. Kesitler açık pembe oluncaya kadar asit alkol solüsyonunda dekolore edilir.
5. Çeşme suyunda 8 dakika yıkanır.
6. Kesitler, açık mavi oluncaya kadar çalışma metilen mavisi solüsyonunda boyanır.
7. Çeşme suyunda yıkanır ve distile suda çalkalanır.
8. Dereceli alkol serileri, absolut alkol ve ksilollerden geçirilir.
9. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi:

Histopatolojik bulgular, ortasında kazeöz nekrotik alan bulunan multiple granulomlardan ibarettir. Bu granulomların merkezindeki nekrozun etrafında epitelioid histiyositler, dev hücreleri ve diğer yagısal hücreler bulunur. En dıştan fibröz kapsül ile çevrilidir. Granümatöz lezyonlar, bağırsakta subserozal yerleşim gösterirler.

ZN boyası ile boyanan doku kesitlerinde; serbest ya da epitelioid hücreler ile dev hücrelerin sitoplazmalarında tek ya da kümeler halinde kırmızı renge boyanmış aside dirençli bakteriler gözlenir.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.06_AVIAN_TB.pdf
- Thoen, C.O. (1997) Tuberculosis. In: Diseases of Poultry. Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., McDougald, L.R., Saif, Y.M., 9th ed., Iowa State University Press, USA, p. 167-178.
- Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd ed., McGraw-Hill Book Company, Newyork, Toronto, London, Sydney, p. 38-39.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

KANATLILARDA MAREK HASTALIĞI'NIN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Kanatlılarda Marek Hastalığı'nın yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir. Hastalıklı materyal ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual, Biosafety and Biosecurity in the Veterinary Microbiology Laboratory and Animal Facilities" bölümü ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_\(bis\).pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_BIOSAFETY_(bis).pdf)) esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HE: Hematoksilen-Eosin.

Marek Hastalığı: Etken, *Herpetoviridae* familyasından *Herpesvirustur*. Karaciğer, böbrek, dalak, gonadlar, pankreas, iris, akciğer, kas ve deride gelişen tümöral, bulaşıcı, öldürücü, lenfoproliferatif viral bir hastalıktır. En önemli bulaşma yolu solunum sistemidir. Kümese giren canlılar da (kemiriciler, kuşlar, böcekler vs) virüsün taşınmasında rol oynarlar. İki şekilde görülür:

1. Akut form: Hastalık hızlı gelişir. Ölüm fazladır. Hastalığın belirtileri aynıdır. Felçler vardır.

2. Kronik form: 10-15 haftalık tavuklarda görülür. Periferik sinirlerin etkilenmesi ile paraliz oluşur. Lokomotor sinirlerin etkilenmesi ile koordinasyon bozukluğu, N. vagus'un etkilenmesiyle kursak genişlemesi, sarkması ve solunum gücüğü gözlenir. Balerin duruşu (bir bacağın öne diğerinin geriye uzatılması) hastalık için karakteristiktir.

Makroskobik olarak iç organlarda, enfeksiyonun şiddetine ve seyrine göre, çeşitli büyüklükte lenfoid tümörlere rastlanır. Yumurtalık, dalak, karaciğer, böbrek, testis, bağırsaklar, bezli mide, kaslar, deri, bursa Fabricius ve kalpte lokalize olmuşlardır. Siyatik sinirler ve plexus brahialis esmerleşmiş ve kalınlaşmıştır, gözlerde gri renk ve depigmentasyona rastlanır.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Kanatlılarda Marek Hastalığı'nın yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için gerekli mikroskobik bulguları açıklamaktır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

Hastalıktan şüpheli kanatlılardan alınan ve %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilen iç organ, deri, göz ve periferal sinir örnekleri, rutin doku işleme yöntemlerine göre işlenerek hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, HE ve Methyl Green-Pyronin ile boyanır ve ışık mikroskopunda muayene edilir. Doku kesitlerinde; iç organ örnekleri ile deri, göz ve periferal sinir örneklerinde lenfoproliferatif lezyonlar ile karakteristik histopatolojik bulguların varlığı aranır.

7.1. Materyal

Hastalıktan şüpheli kanatlılardan alınan iç organ (karaciğer, dalak, böbrek, kalp, bezli mide, taşlık, akciğer, gonadlar, bağırsak, pankreas, beyin, beyincik), deri, göz ve periferal sinir örnekleri incelenir.

7.1.1. Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Etüv

Boyama seti/ Boyama Cihazı

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

%37-40'luk formalin

Dereceli alkoller (60°, 70°, 80°, 96°)

Absolut alkol

Ksilol

Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)

Hazır Hematoksilen-Eosin boyası

Lityum karbonat

Hidroklorik asit, konsantre

Methyl green

Pyronin Y

Asetat buffer (pH 4.1)

Kloroform

Botanol

Entellan

%10'luk Nötral Bufferlı Formalin Solüsyonu

%37-40 formalin	100.0 ml
Distile su	900.0 ml
Sodyum fosfat monobazik	4.0 g
Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)	6.5 g

Doymuş Lityum Karbonatlı Su

Lityum karbonat	1.0 g
Distile su	100.0 ml

Asit Alkol

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asit, konsantre	10.0 ml

Methyl Green Solüsyonu

Methyl green	1.0 g
Asetat buffer pH 4.1	200 ml

Methyl violet kalıntılarından tamamen arınıncaya kadar kloroformda yıkanır.

Boyama solüsyonu

Methyl Green solüsyonu	100 ml
Pyronin Y	200 mg

Solüsyon iyice karıştırılır ve 4 °C de bekletilir, kullanımdan önce filtre edilir.

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1. Dokuların Tespiti:

Doku örnekleri, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir.

7.2.2. Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- ☐ Tespit edilen dokular, trimlenerek kasetlere yerleştirilir.
- ☐ Çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- ☐ Dokular, Doku Takip Cihazı'nda dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir; daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 60°	(120 dakika)
Etanol 70°	(120 dakika)
Etanol 80°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol – Parafin	(120 dakika)
Parafin	(120 dakika)

- ☐ En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3. Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56⁰-60⁰'lik etüvde kurutulur.

7.2.4. Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile kapatılması:

Kesitler HE ile boyanarak üzerlerine lamel kapatılır.

Hematoksilen-Eosin Boyama Metodu:

1. Doku kesitleri, önce 3 adet ksilol kaplarında her birinde 5 dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. 2 adet absolut alkol kaplarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol uzaklaştırılır ve sırasıyla dereceli alkollerden (96⁰, 80⁰, 70⁰) geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.
2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Instant hematoksislen (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 4 dakika boyanır.
4. Çeşme suyunda yıkanır.
5. Asit alkolde dekolore edilerek boyanın fazlası alınır.
6. Çeşme suyunda yıkanır.
7. Lityum karbonatlı suda 5 dakika bekletilir.
8. Alkolik Eosin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 1 dakika boyanır.
9. 70⁰'den başlayarak her birinde 2'şer dakika olmak üzere 80⁰ ve 96⁰'lik alkollerden ve absolut alkollerden geçirilerek eosinin fazlası alınır.
10. Ksilol kaplarında 2'şer dakika tutularak alkolden temizlenir ve şeffaflandırılır.
11. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

Methyl Green-Pyronin Boyama Metodu:

1. Doku kesitleri, önce 3 adet ksilol kaplarında her birinde 5 dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. 2 adet absolut alkol kaplarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol uzaklaştırılır ve sırasıyla dereceli alkollerden (96⁰, 80⁰, 70⁰) geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.
2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Methyl Green-Pyronin boya solüsyonunda 37 °C'de 1 saat boyanır.
4. 1°C'deki distile suda 2 saniye çalkalanır.
5. Kesitler kurutma kağıdı ile kurutulur.
6. Butanolde çalkalanır.
7. 5'er dakika iki kez butanolde dehidre edilir.
8. Ksilol kaplarında 2'şer dakika tutularak alkolden temizlenir ve şeffaflandırılır.
9. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi:

Histopatolojik olarak; hastalığın klasik formunda periferik sinirlerde; Tip A'da; neoplastik yapıda lenfoblastlar, lenfositler ve makrofajların proliferasyonu ile bazofilik, pironinofilik, vakuollü sitoplazmalı ve detayları az belirgin ya da belirgin olmayan nükleuslu “*Marek hastalığı hücreleri*” olarak adlandırılan hücreler aranır. Tip B'de sinirlerde; internöritik ödem, lenfositler ve plazma hücre infiltrasyonu ile Schwann hücre proliferasyonu, Tip C'de ise; çoğunlukla perivasküler az sayıda lenfositlerin varlığı dikkati çeker. Ayrıca Tip A ve B'de demyelinasyon bulguları da sıklıkla görülür.

Hastalığın akut formunda iç organlardaki tümoral lezyonlarda ise anaplastik lenfosit ve lenfoblastların proliferasyonu dikkat çeker.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- ☐ OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.13_MAREK_DIS.pdf
- ☐ Schat, K.A., Nair, V. (2008) Marek's Disease. In: Saif, Y.M., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Swayne, D.E. Diseases of Poultry, 12th ed., p. 452-514.
- ☐ Shane, S.M. (2005) Handbook on Poultry Disease, 2nd ed., p. 69-77.
- ☐ Bancroft, J.D., Cook, H.C. (1984) Manual of Histological Techniques, Churchill Livingstone, Newyork, p. 83.
- ☐ Hofstad, M.S., Barnes, H.J., Calnek, B.W., Reid, W.M., Yoder, H.W. (1984) Diseases of Poultry, 8th ed., Iowa State Press, Ames, Iowa, p. 325-360.
- ☐ Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd ed., McGraw-Hill Book Company, Newyork, Toronto, London, Sydney, p. 38-39.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

Su Hayvanları Hastalıkları



BALIKLARDA VIRAL NERVOUS NECROSIS (VIRAL ENCEPHALOPATHY AND RETINOPATHY)'İN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Deniz balıklarında Nodaviridae familyası Betanodavirus genusunda yer alan viruslar tarafından oluşturulan Viral Nervous Necrosis hastalığının yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Bu teşhis metodu, Patoloji Laboratuvarları için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HE: Hematoksilen-Eosin.

VNN: Viral Encephalopathy ve Retinopathy

Viral Nervous Necrosis (Viral Encephalopathy ve Retinopathy): Hastalık *Nodaviridae* familyası *Betanodavirus* genusunda yer alan viruslar tarafından oluşturulur. Virus, aquatik çevreye oldukça dirençlidirler ve düşük temperatürlü deniz suyunda uzun süre canlı kalabilirler. 25°C ve üstü temperatürlerde, hayatta kalış oranı önemli ölçüde

etkilenir. Hastalık çıkışından sonra aquatik çevrenin bulaşıklığı uzun süre devam eder ve yabani duyarlı türler için de bir enfeksiyon kaynağı oluşturur. Donmuş balıkta da virus uzun periyotlarla canlı kalabilir ve yem olarak çiğ balık kullanılırsa potansiyel bir risk oluşturabilir. Aquatik çevre dışında, virus sitopatojenitesini kolayca kaybeder ve kuru koşullarda 21°C'de 7 günlük bir periyodu takiben >%99 inaktivasyon gözlenmiştir.

Hastalık, özellikle striped jack, Avrupa levreği (*Dicentrarchus labrax*), *Serranidae* familyası *Epinephelinae* alt familyasındaki birçok genusa ait balıklar ile yassı balıklar gibi deniz balıklarında önemli olmakla birlikte 50'den fazla balık türünden bildirilmiştir. Tatlı su çiftliklerinden de hastalık bildirimi olmuştur. Özellikle larval ve juvenil devreler etkilenir. Ancak pazar boyutuna ulaşmış ve ergin balıklarda da ciddi mortaliteler bildirilmiştir. Enfekte çiftliklerde etkeni tespit etme olasılığı, yumurtlama mevsimi süresince virus damızlığın gonadlarında bulunabilmesine rağmen juvenillerde erginlerden daha yüksektir. Bu sebeple survey programları, gonadal dokular, ovaryum sıvıları ve dalak kadar genç balıkları da kapsamalıdır.

Beyin, spinal kord ve retina, yaygın doku vakuolasyonuna sebep olan virusun aktif şekilde replike olduğu hedef organlardır. Striped jack, Avrupa levreği, barfin flounder (*Verasper moseri*), seven-

band grouper ve Atlantik halibut gibi bazı türlerde damızlık balıklar, virus rezervuarıdır ve larva ve juvenil balıklar için de en önemli enfeksiyon kaynağıdır. Enfeksiyonu atlatan balıklar, uzun periyotlar boyunca virusu taşır ve diğer balıklara enfeksiyonu bulaştırabilirler.

Virus, bağırsak epiteli ve perifer sinir sistemi yoluyla konakçıya girer, çok kısa sürede sentral sinir dokularına ulaşarak konakçının ölümüne sebep olur ya da hayatta kalanlarda birkaç yıl kalabilir. Ölü dekompoze balıklar farklı biyolojik vektörler yoluyla çevrede virusu yayabilir. Virus, balıkların gelişen gonadlarında tespit edildiğinden bazı türlerde vertikal bulaşmadan şüphelenilmiştir.

Klinik bir salgın süresince *Betanodaviruslar*, çiftliğin bir kesiminden diğerine suyla, kontamine personel, ağ, çizme ve diğer ekipmanla direkt olarak kolayca bulaşabilir. Açık denizlerde akıntılar, farklı çiftlikleri ziyaret eden botlar ve göç eden yabancı balıklarla da bulaşma oluşur. Ichthyophagous kuşlar potansiyel vektörler olarak kabul edilirler. Bulaşık bölgelerden orijin alan yumuşakçalar da dikkate alınmalıdır. Virus, enfekte bir çiftliğe yakın toplanan *Nereidae* familyasına ait kum kurtlarından izole edilmiştir.

Hastalık, bozulmuş yüzme davranışları gibi birçok nörolojik anormalliklerle karakterizedir. Su sıcaklığı önemli bir faktördür ve klinik bulguların ortaya çıkışını etkiler. Genel olarak yüksek sıcaklıklarda, erken hastalık ve yüksek mortalite oluşur. Striped jack'te hastalık en erken kuluçkadan çıktıktan sonraki 2. günde oluşmasına rağmen mortaliteler en çok 10 gün içinde gözlenir. Avrupa levreğinde, kuluçkadan çıktıktan sonraki 30 güne kadar mortalite görülmez fakat pazar boyutunda bile salgınlar oluşabilir. Mortalite oranı yaşa bağlıdır. Larval devreler etkilendiğinde %100'e ulaşan mortaliteler gözlenir. Halbuki juvenil ve ergin balıklarda daha düşük kayıplar oluşur.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Balıklarda Viral Nervous Necrosis hastalığının yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için gerekli mikroskopik bulguları açıklamaktır.

7. TEST METODUNUN TANIMI

Klinik hastalık şüphesi durumunda; larva veya juveniller bütün halde, büyük balıklarda ise beyin, spinal kord ve gözler %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir. Rutin doku işleme yöntemlerine göre işlenerek hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, HE ile boyanır ve ışık mikroskopunda muayene edilir. Doku kesitlerinde; beyin, spinal kord ve retinal dokularda intranöronal vakuolasyonun varlığı aranır.

7.1. Materyal

Hastalıktan şüpheli larva ve juveniller ile büyük balıklarda beyin, spinal kord ve göz örnekleri incelenir.

7.1.1. Kullanılan Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Etüv

Boyama seti/ Boyama Cihazı

Işık mikroskobu

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

%37-40'lık formalin

Dereceli alkoller (60°, 70°, 80°, 96°)

Absolut alkol

Ksilol

Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)

Hazır Hematoksilen-eosin boyası

Lityum karbonat

Hidroklorik asit, konsantre

Entellan

%10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonu

%37-40 formalin	100.0 ml
Distile su	900.0 ml
Sodyum fosfat monobazik	4.0 g
Sodyum fosfat dibazik (anhidroz)	6.5 g

Doymuş Lityum karbonatlı su

Lityum karbonat	1.0 g
Distile su	100.0 ml

Asit alkol

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asit, konsantre	10.0 ml

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1. Dokuların Tespiti:

Örnekler, %10'luk nötral bufferlı formalin solüsyonunda tespit edilir.

7.2.2. Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- ☐ Tespit edilen dokular, trimlenerek kasetlere yerleştirilir.
- ☐ Çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- ☐ Dokular, Doku Takip Cihazı'nda dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir; daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 60°	(120 dakika)
Etanol 70°	(120 dakika)
Etanol 80°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)
Etanol 96°	(120 dakika)

Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Absolut etanol 100°	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol	(120 dakika)
Ksilol – Parafin	(120 dakika)
Parafin	(120 dakika)

- En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3. Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56°-60°lik etüvde kurutulur.

7.2.4. Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile Kapatılması:

Kesitler HE ile boyanarak üzerlerine lamel kapatılır.

Hematoksilen-Eosin Boyama Metodu

1. Doku kesitleri, önce 3 adet ksilol kaplarında her birinde 5 dakika olmak üzere tutularak parafin uzaklaştırılır. 2 adet absolut alkol kaplarında her birinde 1'er dakika tutularak ksilol uzaklaştırılır ve sırasıyla dereceli alkollerden (96°, 80°, 70°) geçirilerek her birinde 1'er dakika olmak üzere dehidre edilir.
2. Distile suda 15 dakika tutularak rehidre edilir.
3. Instant hematoksin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 4 dakika boyanır.
4. Çeşme suyunda yıkanır.
5. Asit alkolde dekolore edilerek boyanın fazlası alınır.
6. Çeşme suyunda yıkanır.
7. Lityum karbonatlı suda 5 dakika bekletilir.
8. Alkolik Eosin (ticari hazır boya prospektüsüne göre) ile 1 dakika boyanır.
9. 70°den başlayarak her birinde 2'şer dakika olmak üzere 80° ve 96°lik alkollerden ve absolut alkollerden geçirilerek eosinin fazlası alınır.
10. Ksilol kaplarında 2'şer dakika tutularak alkolden arındırılır ve şeffaflandırılır.
11. Üzerlerine lamel yapıştırılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi :

Histopatolojik muayenede, HE ile boyanan beyin, spinal kord ve gözlerden hazırlanan kesitlerde, beyin gri maddesinde özellikle optik tektum ve serebellumda, daha az olarak da telensefalonda ve medulla oblongatada ve retinanın nuklear tabakalarında vakuolasyon, sinir hücrelerinde yaklaşık 5 µm çapında intrasitoplazmik inklüzyonlar ve nöronal nekroz gözlenir.

Bu lezyonlar, larva ve juvenillerde çok belirgindir. Ergin semptomatik balıklarda çok nadirdir ve saptaması güçtür. Yangısal reaksiyon görülmez. Makrofajların varlığı muhtemelen sekonder enfeksiyondan dolayıdır.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE (2012) Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/2010/2.3.11_VER.pdf
- Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd ed., McGraw-Hill Book Company, Newyork, Toronto, London, Sydney, p. 38-39.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

YASSI İSTİRİDYELERDE (*OSTREA EDULIS*) BONAMIOSIS'İN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Yassı istiridyelerde (*Ostrea edulis*) Bonamiosis'in yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Çift kabuklu yumuşakça hastalıklarının histopatolojik muayenesini yapan Bölüm/Laboratuvarlar için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

- ☐ Hastalık izleme amaçlı muayenelerde; yassı istiridye örnekleri laboratuvara canlı olarak ulaştırılmalıdır.
- ☐ İstiridye kabuklarının açılması sırasında oluşabilecek yaralanmalara karşı dikkatli olunmalıdır.
- ☐ Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritatan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HE: Hematoksilen- Eosin

Oyster: İstiridye

***Ostrea edulis* (O. edulis):** Avrupa yassı istiridyesi (*European flat oyster*).

Bonamiosis: Kuzey Yarımkürede yassı istiridyelerin (*Ostrea edulis*) haplosporidian bir parazit olan *Bonamia* spp. tarafından meydana getirilen öldürücü bir hemosit hastalığıdır. Avrupada *Bonamia ostreae* ve *Bonamia exitiosa* olmak üzere iki tür gözlenmiştir. *Bonamia ostreae* ve *B. exitiosa* ile enfeksiyon, OIE tarafından listelenen ve Ülkemizde de ihbarı mecburi olan hastalıklardır.

Avrupa yassı istiridyesi *Ostrea edulis*, *Bonamia ostreae*'nin doğal konakçısıdır. Parazitin endemik olduğu bölgelere transfer edildiklerinde enfekte olabilen diğer istiridye türleri, *Ostrea puelchana*, *O. angasi* ve *O. chilensis* (= *Triostrea chilensis*, *T. lutaria*) olarak bildirilir.

Bonamia exitiosa'ya duyarlı istiridye türleri, *O. chilensis* (= *Triostrea chilensis*, *T. lutaria*), *O. angasi* ve *O. edulis*'dir. *B. exitiosa*, 2006 yılında İspanya'nın Galicia sahillerinde yetiştirilen yassı istiridyelerde (*Ostrea edulis*) tespit edilmiştir. Bildirilen maksimum parazit prevalansı, Ekim ayında toplanan örneklerde % 34'tir. Örneklem tarihleri arasında bazı prevalans farklılıkları gözlenmesine rağmen, günümüzde Avrupada yassı istiridyelerde *B. exitiosa* ile enfeksiyonun yıllık seyri bilinmemektedir.

Bonamia ostreae ile enfeksiyon, yıl boyunca oluşabilir. İki yaşından büyük istiridyeler enfeksiyona daha duyarlıdır. Enfeksiyon prevalansı ve yoğunluğu yaz mevsimi süresince artar

ve sonbaharda pik yapar. Prepatent periyod, genellikle 3- 4 aydır fakat 5 aya kadar çıkabilir. *Bonamia ostreae*, birlikte tutulan yassı istiridyeler arasında direkt olarak ya da purifiye parazitlerin inokülasyonu ile bulaştırılabilir. Letal enfeksiyonlar, genellikle maruz kalıştan sonraki 3- 6 ay içinde gelişir.

Enfekte istiridyelerin çoğu normal görünmesine rağmen, hastalık bazen solungaçlarda ve mantoda sarımsı renk değişimi ve yaygın lezyonlara sebep olabilir. Lezyonlar, solungaçların, manto ve sindirim bezinin bağdokusunda enfekte hemosit infiltrasyonları ile karakterizedir. İnfiltrate olan hemositlerin çoğu, sitoplazmik vakuoller içinde parazitleri kapsar. Başlangıçta çoğunlukla solungaçlarda lokalize olan intrahemositik enfeksiyon giderek ilerler ve sistemik hale geçerek istiridyenin ölümüne yol açar.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Bonamiosis'in yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için doku kesitlerinde, hastalık etkeni olan *Bonamia spp.*'nin varlığının aranmasını kapsar.

7. TEST METODUNUN TANIMI

Davidson solüsyonunda tespit edilen istiridye doku örnekleri, rutin histolojik doku işleme yöntemlerine göre işlenerek hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, HE ile boyanır ve *Bonamia spp.*'nin varlığı yönünden ışık mikroskobunda muayene edilirler.

7.1. Materyal

Canlı ya da taze ölü yassı istiridyeler incelenir.

Kabukları açılarak çıkarılan istiridyelerin yumuşak dokularından solungaçlar ve mantoyu kapsayacak şekilde gonadlar ve sindirim bezinden geçen dorsoventral bir kesit ya da küçük istiridyelerde, kabuk uzaklaştırıldıktan sonra istiridyenin tümü alınır.

7.1.1 Kullanılan Alet-Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Su banyosu

Etüv

Boyama seti / Boyama Cihazı

Işık mikroskobu (Koehler büyütme tekniğine uyumlu)

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

7.1.2.1. Dokuların Tespitinde Kullanılan Kimyasallar

Davidson solüsyonu

Deniz suyu	1200 ml
%95 Alkol	1200 ml
%37 formaldehid	300 ml
Gliserol	400 ml
Glasial asetik asit	%10

Carson solüsyonu

NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	23.8 g
NaOH	5.2 g
Distile su	900 ml
%37 formaldehid	100 ml

%10 formalin solüsyonu

Formaldehid %37-40	10 ml
Deniz suyu (filtre edilmiş)	90 ml

7.1.2.2. Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesinde Kullanılan Kimyasallar

96° etanol ve bundan hazırlanan dereceli alkoller

Absolut etanol

Ksilol

Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)

7.1.2.3. Doku Kesitlerinin Boyanmasında Kullanılan Kimyasallar

Hematoksilen

Eosin

Asit alkol

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asit, konsantre	10.0 ml

7.1.2.4. Doku Kesitlerinin Üstüne Lamel Kapatılmasında Kullanılan Kimyasallar

Entellan

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1. Dokuların Tespiti:

Kabukları açılarak çıkarılan istiridyelerin yumuşak dokularından solungaçlar ve mantoyu kapsayacak şekilde gonadlar ve sindirim bezinden geçen dorsoventral bir kesit ya da küçük istiridyelerde, kabuk uzaklaştırıldıktan sonra istiridyenin tümü kasetler içine alınarak histolojik muayeneler için Davidson solüsyonuna konarak tespit edilir. Tespit amacıyla filtre edilmiş deniz suyundan hazırlanmış %10 formalin solüsyonu da kullanılabilir. Alınan ilk kesite bitişik diğer bir kesit Carson solüsyonuna alınarak elektron mikroskopik muayeneler için kullanılabilir ya da kalan istiridye dokuları teyitsel teşhis metotlarından PCR-RFLP ve insitu hibridizasyon için -20° C'de ya da %70'lik etanol içinde saklanabilir.

7.2.2.Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- Tespit edilen dokular çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- Dokular, Doku Takip Cihazında dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir ve daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 75 ⁰	(30 dakika)
Etanol 90 ⁰	(30 dakika)
Etanol 95 ⁰	(30 dakika)
Absolut etanol 100 ⁰	(15 dakika)
Absolut etanol 100 ⁰	(30 dakika)
Absolut etanol 100 ⁰	(60 dakika)
Ksilol	(30 dakika)
Ksilol	(60 dakika)
Ksilol	(60 dakika)
Parafin	(45 dakika)
Parafin	(45 dakika)
Parafin	(45 dakika)

- En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3.Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından, her bir istiridye için 2 adet olmak üzere mikrotom ile 2-3 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56⁰-60⁰'lik etüvde kurutulur.

7.2.4.Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile Kapatılması:

- Doku kesitleri, aşağıda belirtilen sıra ve sürelerde önce ksilol ile muamele edilerek parafinden arındırılır, daha sonra absolut etanol'den geçirilerek ksilol giderilir ve çeşme suyuna alınarak doku takip işlemleri sırasında dehidre edilen dokuların tekrar su alması sağlanır.

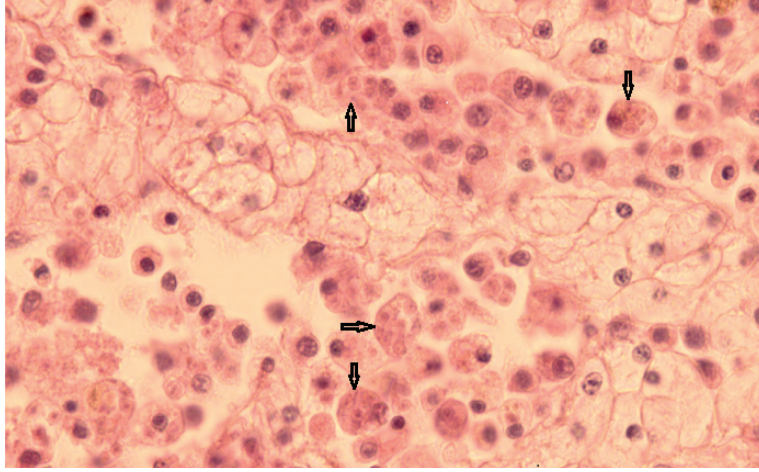
Ksilol	(15 dakika)
Ksilol	(15 dakika)
Absolut etanol 100 ⁰	(15 dakika)
Çeşme suyu	(5 dakika)
· Doku kesitlerine HE boyama metodu uygulanır.	
Hematoksilen	(3 dakika 30 saniye)
Çeşme suyu	(5 dakika)
Asit alkol	(15 saniye)
Çeşme suyu	(5 dakika)
Eosin	(30 saniye)
Çeşme suyu	(5 dakika)
· Boyanmış doku kesitleri, absolut alkollerden ve ksilollerden geçirilerek şeffaflandırılır.	
Absolut etanol 100 ⁰	(1 dakika)
Absolut etanol 100 ⁰	(1 dakika)
Absolut etanol 100 ⁰	(1 dakika)
Ksilol	(2 dakika)
Ksilol	(5 dakika)

- Boyama süresinin sonunda lamalar, pens ile tutularak teker teker ksilolden alınır. Kesit üzerine pastör pipeti ile 1-2 damla yapıştırıcı konur ve üzerine doku kesitini tamamen içine alacak şekilde lamel kapatılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

Histopatolojik muayenede; enfeksiyon solungaçlar, manto, sindirim bezi/gonadların bağdokusunda ve vasküler sinüslerde bazısı ya da çoğu parazitli değişen derecelerde hemosit infiltrasyonları ile karakterizedir. *Bonamia* spp., infiltrate hemositler içinde veya ekstraselüler olarak gözlenir. Parazitler, 2-5 µm büyüklükte çok küçük hücreler olarak görülür. *B. exitiosa*, *B. ostreae*'dan daha büyük olup daha sentral bir nukleusa sahiptir. Pozitif bir teşhis için, parazit hemositler içinde görülmelidir (Resim 1).

Sonuçlar, kalitatif olarak (enfekte=pozitif/enfekte olmayan=negatif) ifade edilir. Ayrıca yarı kalitatif skalaya göre de ifade edilebilir.



Resim 1. Hemosit sitoplazmalarında (oklar) ve bağdokuda serbest parazitler, *Bonamia exitiosa*, HE, X1000. (Bornova Vet. Kont. Ens. Patoloji Bölümü Arşivi)

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE (2012) Infection with *Bonamia ostreae*. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/2010/2.4.03_B_OST.pdf
- OIE (son baskı) Infection with *Bonamia exitiosa*. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/2010/2.4.02_B_EXIT.pdf
- NOAA (1983) Histological Techniques for Marine Bivalve Mollusks, NOAA Technical Memorandum NMFS-F/NEC-25, U.S. Department of Commerce, NOAA, National Marine Fisheries Service, p.97.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

YASSI İSTİRİDYE (*OSTREA EDULIS*) VE MİDYELERDE (*MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*) MARTEILIOSIS'İN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Yassı istiridye (*Ostrea edulis*) ve midyelerde (*Mytilus galloprovincialis*) Marteiliosis'in yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Çift kabuklu yumuşakça hastalıklarının histolojik muayenesini yapan Bölüm/Laboratuvarlar için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

- ☐ Hastalık izleme amaçlı muayenelerde; yassı istiridye ve midye örnekleri laboratuvara canlı olarak ulaştırılmalıdır.
- ☐ İstiridye ve midye kabuklarının açılması sırasında oluşabilecek yaralanmalara karşı dikkatli olunmalıdır.
- ☐ Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

Oyster: İstiridye

***Ostrea edulis* (O. edulis):** Avrupa yassı istiridyesi (*European flat oyster*)

***Mytilus galloprovincialis*:** Kara midye (*Mediterranean mussel*)

Marteiliosis: Yassı istiridye ve midyelerin Paramyxea familyası *Marteilia* genusundan protistan bir parazit olan *Marteilia refringens* tarafından meydana getirilen hastalıdır. Parazitin O ve M olmak üzere 2 genetik tipi belirlenmiştir.

Marteilia refringens, *Ostrea* türü istiridye (O. *edulis*, O. *chilensis*, O. *puelchana*, O. *angasi* ve O. *denselamellosa*) ve midyeleri (*Mytilus galloprovincialis* ve *Mytilus edulis*) enfekte eder. *Marteilia refringens* ile enfeksiyon, OIE tarafından listelenen ve Ülkemizde de ihbarı mecburi olan bir hastalıdır.

Bulaşma bir arakonakçı vasıtasıyla olur. Bazı zooplankton türleri ile copepod türlerinin vektör olarak rol oynayabileceği bildirilmiştir. Enfeksiyon, laboratuvarında deneysel olarak bulaştırılamamıştır.

Enfeksiyon, mevsimsel değildir. 17°C su ısısı, parazitin sporlanması için başlangıç eşiği olarak kabul edilir. Bu yüzden ölümler, yaz ve sonbaharda oluşur ve parazitin sporlanması ile ilişkilidir. Morbidite ılık mevsimler süresince daha yüksektir. Yüksek tuzluluk oranına sahip sular, *Marteilia*

spp.nin gelişimini sınırlar. Duyarlı yaş grubu; genellikle juvenil ve ergin hayat devreleridir. İstiridye ve midyelerde, 2 yaşın üstündeki yumuşakçalar daha yüksek enfeksiyon prevalansı ve yoğunluğuna sahiptirler.

Marteilia refringens, *O. edulis* ve diğer *Ostrea* türü istiridyelerde klinik enfeksiyona sebep olur ve ölüme yol açar. Ölüm, ilk enfeksiyondan sonraki ikinci yılda oluşur ve %98'e varan yüksek prevalans beklenebilir. Bu yüzden enfeksiyon bir yıldan daha uzun sürebilir ve hayat boyu kalabilir. Bazı istiridyelerde de parazit, hastalık oluşturmaksızın bulunabilir. *Ostrea edulis*'in yabancı popülasyonlarında ve midyelerde ise klinik hastalık ve mortalite görülmeyebilir.

Marteilia refringens, sindirim bezini enfekte eder. Parazitin sporlanma öncesi genç devreleri (plasmodyum), labial palpler, mide, sindirim bezi kanalları ve muhtemelen solungaçların epitelinde bulunur. Sporlanma ise sindirim bezi tubul ve kanallarında oluşur. Serbest sporangia'lar, sindirim kanalı lumenine salınır ve dışkı ile çevreye yayılır.

Hastalığın klinik bulguları, aşırı zayıflama, sindirim bezinin renksizleşmesi, gelişimin durması, doku nekrozları ve mortalitelerdir. *M. refringens* ile enfekte olan istiridyeler, tamamen rezorbe olmuş gonadlara sahip olup kötü kondüsyondadır. Enfeksiyon derecesi ve mortalite arasında tutarlı bir ilişki yoktur. Yüksek enfeksiyon prevalansına sahip bölgelerdeki bazı istiridyeler, önemli sayıda parazit olmaksızın karakteristik hastalık bulguları gösterdiği halde parazit ile ağır şekilde enfekte olanlar hiçbir hastalık bulgusu göstermeyebilirler.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Marteiliosis'in yaklaşımsal histolojik teşhisi için doku kesitlerinde, hastalık etkeni olan *Marteilia* spp.'nin gelişim devrelerinin aranmasını kapsar.

7. TEST METODUNUN TANIMI

Davidson solüsyonunda tespit edilen istiridye ve midye doku örnekleri, rutin histolojik doku işleme yöntemlerine göre işlenerek, hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, HE boyası ve *Marteilia refringens* için protozoonun daha kolay görülmesine imkan veren üçlü boyamalar (Millot'un ya da Masson'un üçlü boyaması vs.) gibi özel boyalar ile boyanır ve *Marteilia spp.*'nin varlığı yönünden ışık mikroskopunda muayene edilirler.

7.1. Materyal

Canlı ya da taze ölü yassı istiridye ve midyeler.

Kabukları açılarak çıkarılan istiridye ve midyelerin sindirim bezinden geçecek şekilde dorsoventral bir kesit alınır.

7.1.1 Kullanılan Alet-Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Su banyosu

Etüv

Boyama seti / Boyama Cihazı

Işık mikroskobu (Koehler büyütme tekniğine uyumlu)

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

7.1.2.1. Dokuların Tespitinde Kullanılan Kimyasallar

Davidson solüsyonu

Deniz suyu	1200 ml
%95 Alkol	1200 ml
%37 formaldehid	300 ml
Gliserol	400 ml
Glasial asetik asit	%10

%10 formalin solüsyonu

Formaldehid %37-40	10 ml
Deniz suyu (filtre edilmiş)	90 ml

7.1.2.2. Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesinde Kullanılan Kimyasallar

96° etanol ve bundan hazırlanan dereceli alkoller

Absolut etanol

Ksilol

Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)

7.1.2.3. Doku Kesitlerinin Boyanmasında Kullanılan Kimyasallar

Hematoksilen

Eosin

Asit alkol

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asit, konsantre	10.0 ml

Weigert's demir hematoksileni

Solüsyon A

Hematoksilen kristal	1.0 g
Alkol , %95	100.0 ml
Distile su	100.0 ml

Solüsyon B

%30 aqueous Ferrik klorid	4.0 ml
Konsantre hidroklorik asid	1.0 ml

A ve B solüsyonları eşit hacimlerde birbirine eklenir.

Ponceau-asid fuksin solüsyonu

Fuksin asid	0.1 g
Ponceau	0.2 g
Distile su	300 ml
Asetik asid	0.6 ml

Orange G

Orange G	10 g
Distile su	500 ml
Asid fosfomolibdik	5 g

Light green solüsyonu

Light green	0.5 g
Distile su	500 ml
Glacial Asetik asid	2 ml

7.1.2.4. Doku Kesitlerinin Üstüne Lamel Kapatılmasında Kullanılan Kimyasallar

Entellan

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1. Dokuların Tespiti:

Kabukları açılarak çıkarılan istiridye ve midyelerin sindirim bezinden geçecek şekilde dorsoventral alınan bir kesit histolojik muayeneler için Davidson solüsyonuna konarak tespit edilir. Tespit amacıyla filtre edilmiş deniz suyundan hazırlanmış %10 formalin solüsyonu da kullanılabilir. Kalan yumuşak dokular, teyitsel teşhis metodlarından PCR-RFLP ve in situ hibridizasyon için -20° C'de ya da %70'lik etanol içinde saklanabilir.

7.2.2.Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- ☐ Tespit edilen dokular çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- ☐ Dokular, Doku Takip Cihazında dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir ve daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 75 ⁰	(30 dakika)
Etanol 90	(30 dakika)
Etanol 95	(30 dakika)
Absolut etanol 100	(15 dakika)
Absolut etanol 100	(30 dakika)
Absolut etanol 100	(60 dakika)
Ksilol	(30 dakika)
Ksilol	(60 dakika)
Ksilol	(60 dakika)
Parafin	(45 dakika)
Parafin	(45 dakika)
Parafin	(45 dakika)

- ☐ En son parafin kablarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

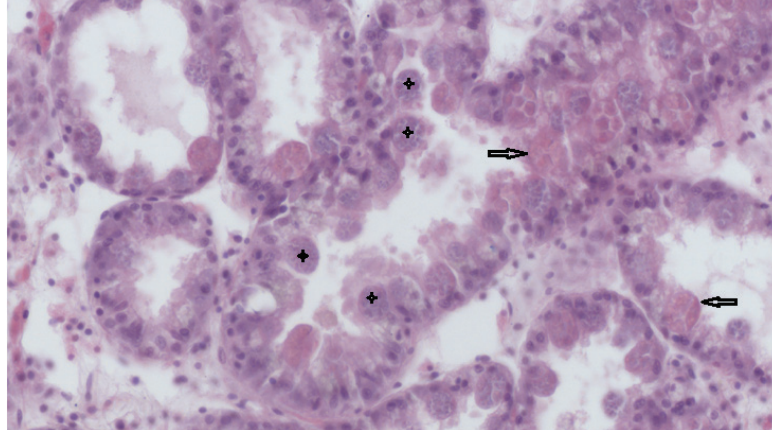
7.2.3.Doku Kesitlerinin hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından, her bir yumuşakça için 2 adet olmak üzere mikrotom ile 2-3 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56⁰-60⁰lik etüvde kurutulur.

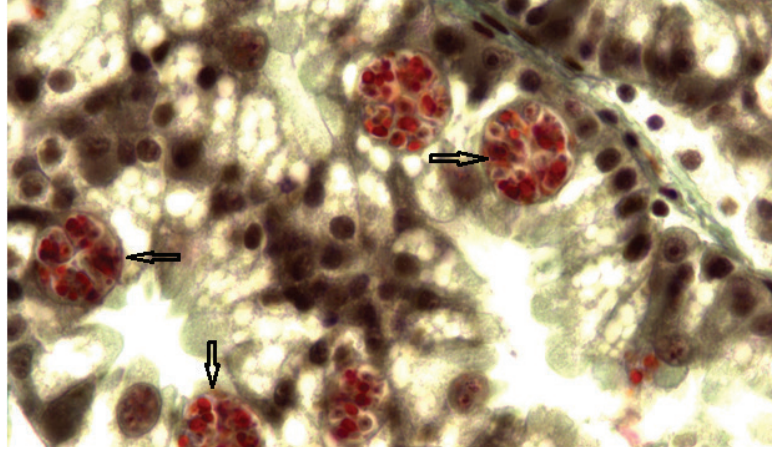
7.3.Sonuçların Değerlendirilmesi:

Histolojik kesitlerde; Hematoksilen-eosin ile boyanan kesitlerde; *Marteilia refringens*'in genç devresi olan plasmodyumlar, 5-8 µm büyüklüğünde olup mide, bağırsak ve sindirim bezi kanallarının epitellerinde ve bazen sindirim bezi tubullerinde görülür (Resim 1 ve 2). Bazen bağırsak lumeninde de gözlenebilirler. Sadece olgun sporlarda bulunan refringent granüller, koyu portakal-kırmızı renktedir.

Sonuçlar, kalitatif olarak (enfekte=pozitif/enfekte olmayan=negatif) ifade edilir. Ayrıca yarı kalitatif skalaya göre de ifade edilebilir.



Resim 1. Tubul epitelyumunda parazitin sporangia (yıldız) ve spor formları (oklar), *Marteilia refringens*, Sindirim sistemi, HE. (Bornova Vet. Kont. Ens. Patoloji Bölümü Arşivi)



Resim 2. Tubul epitelyumunda parazitin spor formları (oklar), *Marteilia refringens*, Sindirim sistemi, Masson'un üçlü boyaması, x1000. (Bornova Vet. Kont. Ens. Patoloji Bölümü Arşivi)

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE (2012) Infection with *Marteilia refringens*. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/2010/2.4.04_M_REF.pdf
- NOAA (1983) Histological Techniques for Marine Bivalve Mollusks, NOAA Technical Memorandum NMFS-F/NEC-25, U.S. Department of Commerce, NOAA, National Marine Fisheries Service, p.97.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

YASSI İSTİRİDYELERDE (*OSTREA EDULIS*) MIKROCYTOSIS'IN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Yassı istiridyelerde (*Ostrea edulis*) Mikrocytosis'in yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Çift kabuklu yumuşakça hastalıklarının histolojik muayenesini yapan Bölüm/Laboratuvarlar için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

- ☐ Hastalık izleme amaçlı muayenelerde; yassı istiridye örnekleri laboratuvara canlı olarak ulaştırılmalıdır.
- ☐ İstiridye kabuklarının açılması sırasında oluşabilecek yaralanmalara karşı dikkatli olunmalıdır.
- ☐ Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

Crassostrea gigas: Pasifik istiridyesi (Pasific oyster).

Crassostrea virginica: Doğu istiridyesi (Eastern oyster).

HE: Hematoksilen- Eosin

Mikrocytos mackini: Kuzey Amerika'nın batı sahillerindeki istiridyelerin taksonomisi kesinleşmemiş ökaryotik protistan bir parazittir.

Ostrea conchaphila: Pasifik yassı istiridyesi (Pasific flat oyster).

Ostrea edulis: Avrupa yassı istiridyesi (European flat oyster).

Mikrocytosis: Başta Pasifik istiridyesi (*Crassostrea gigas*) olmak üzere bazı istiridye türlerinin (Doğu istiridyesi *Crassostrea virginica*, Avrupa yassı istiridyesi *Ostrea edulis* ve Pasifik yassı istiridyesi *Ostrea conchaphila*) *Mikrocytos mackini* olarak adlandırılan ve mikrosel tarafından meydana getirilen hastalıdır. Hastalık, Denman Island hastalığı, Denman hastalığı ve Pasifik istiridyelerinin mikrosel hastalığı olarak da bilinir. Deneysel koşullarda *Crassostrea gigas*'ın hastalığa diğer istiridye türlerinden daha dirençli olduğu görülmüştür.

Filogenetik analiz, *M. mackini*'nin şekilce *Bonamia* grubu parazitlere çok benzer olmasına rağmen *Bonamia* spp.'yi kapsayan Haplosporidian gruba ilgili olmadığını göstermiştir. Günümüzde *M. mackini*'nin *Mikrocytos* genusunun tek temsilcisi olduğu görülür.

M. mackini'nin konakçı dışındaki hayat siklusu bilinmemesine rağmen deneysel olarak laboratuvar da enfekte ve sağlam istiridyeleri aynı ortamda tutarak ya da purifiye parazitlerin

intramuskuler inokülasyonu ile hastalığı bulaştırmak mümkündür.

Makroskobik olarak patognomonik olmamasına rağmen genellikle labial palplerin ve mantonun yüzeyinde ya da adduktor kasında istiridyelerin pazar değerini düşürebilen ülser, apse ya da yeşil renkli püstüller görülür. Manto yüzeyindeki apseye yakın kabukta sıklıkla kahverengi bir skar kalır. Şiddetli enfeksiyonlar 2 yaşın üstündeki ergin istiridyelere sınırlıdır. Hastalık, genellikle Şubat-Haziran aylarında oluşur ve Nisan-Mayısta en yüksek prevalansa ulaşır. Bu yüzden mortaliteler, çoğunlukla su ısının 10° C'nin altında olduğu 3-4 aylık bir periyodu takiben Nisan ve Mayıs aylarında ortaya çıkar. Düşük gel git seviyelerinde kültürü yapılan ergin *C. gigas*'ta yaklaşık % 30'a varan mortaliteler gözlenmiştir. Enfekte *C. gigas*'ın yaklaşık %10'unun ise iyileştiği görülür.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Mikrocytosis'in yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için doku kesitlerinde, hastalık etkeni olan *Mikrocytos* sp.'nin aranmasını kapsar.

7. TEST METODUNUN TANIMI

Davidson solüsyonunda tespit edilen istiridye doku örnekleri, rutin histolojik doku işleme yöntemlerine göre işlenerek, hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, HE ile boyanır ve *Mikrocytos* sp.'nin varlığı yönünden ışık mikroskobunda muayene edilirler.

7.1. Materyal

Canlı ya da taze ölü yassı istiridyeler incelenir.

Kabukları açılarak çıkarılan istiridyelerin labial palp, manto ve sindirim bezinden geçecek şekilde dorsoventral bir kesit ve adduktor kasından bir kesit alınır.

7.1.1 Kullanılan Alet-Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Su banyosu

Etüv

Boyama seti / Boyama Cihazı

Işık mikroskobu (Koehler büyütme tekniğine uyumlu)

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

7.1.2.1. Dokuların Tespitinde Kullanılan Kimyasallar

Davidson solüsyonu

Deniz suyu	1200 ml
%95 Alkol	1200 ml
%37 formaldehid	300 ml
Gliserol	400 ml
Glasial asetik asit	%10

%10 formalin solüsyonu

Formaldehid %37-40	10 ml
Deniz suyu (filtre edilmiş)	90 ml

7.1.2.2.Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesinde Kullanılan Kimyasallar

96^o etanol ve bundan hazırlanan dereceli alkoller

Absolut etanol

Ksilol

Parafin (56-60^oC'de eriyebilirlik)

7.1.2.3. Doku Kesitlerinin Boyanmasında Kullanılan Kimyasallar

Hematoksilen

Eosin

Asit alkol

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asit, konsantre	10.0 ml

7.1.2.4. Doku Kesitlerinin Üstüne Lamel Kapatılmasında Kullanılan Kimyasallar

Entellan

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1.Dokuların Tespiti:

Kabukları açılarak çıkarılan istiridyelerin labial palp, manto ve sindirim bezinden geçecek şekilde dorsoventral alınan bir kesit ile adduktor kasından alınan bir kesit histopatolojik muayeneler için Davidson solüsyonuna konarak tespit edilir. Tespit amacıyla filtre edilmiş deniz suyundan

hazırlanmış %10 formalin solüsyonu da kullanılabilir. Kalan yumuşak dokular, teyitsel teşhis metodlarından PCR-RFLP için -20⁰ C'de ya da %70'lik etanol içinde saklanabilir.

7.2.2.Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- ☐ Tespit edilen dokular çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- ☐ Dokular, Doku Takip Cihazında dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir ve daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 75 ⁰	(30 dakika)
Etanol 90	(30 dakika)
Etanol 95	(30 dakika)
Absolut etanol 100	(15 dakika)
Absolut etanol 100	(30 dakika)
Absolut etanol 100	(60 dakika)
Ksilol	(30 dakika)
Ksilol	(60 dakika)
Ksilol	(60 dakika)
Parafin	(45 dakika)
Parafin	(45 dakika)
Parafin	(45 dakika)

- ☐ En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3.Doku Kesitlerinin hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından, her bir istiridye için 2 adet olmak üzere mikrotom ile 2-3 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56⁰-60⁰'lik etüvde kurutulur.

7.2.4.Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile kapatılması:

- ☐ Doku kesitleri, aşağıda belirtilen sıra ve sürelerde önce ksilol ile muamele edilerek parafinden arındırılır ve daha sonra absolut etanol'den geçirilerek ksilol giderilir ve çeşme suyuna alınarak doku takip işlemleri sırasında dehidre edilen dokuların tekrar su alması sağlanır.

Ksilol	(15 dakika)
Ksilol	(15 dakika)
Absolut etanol	(15 dakika)
Çeşme suyu	(5 dakika)
☐ Doku kesitlerine HE boyama metodu uygulanır.	
Hematoksilen	(3 dakika 30 saniye)
Çeşme suyu	(5 dakika)
Asit alkol	(15 saniye)
Çeşme suyu	(5 dakika)
Eosin	(30 saniye)

Çeşme suyu

(5 dakika)

□ Boyanmış doku kesitleri, absolut alkollerden ve ksilollerden geçirilerek şeffaflandırılır.

Absolut etanol (1 dakika)

Absolut etanol (1 dakika)

Absolut etanol (1 dakika)

Ksilol (2 dakika)

Ksilol (5 dakika)

□ Boyama süresinin sonunda lamalar, pens ile tutularak teker teker ksilolden alınır. Kesit üzerine pastör pipeti ile 1-2 damla yapıştırıcı konur ve üzerine doku kesitini tamamen içine alacak şekilde lamel kapatılır.

7.3.Sonuçların Değerlendirilmesi:

Hematoksilen Eosin ile boyanan histolojik doku kesitlerinde; *Mikrocytos mackini*, palpler, manto ve sindirim bezinin veziküler bağdoku hücrelerinde yoğun hemosit infiltrasyonu ile birlikte 2-4 µm büyüklükte intraselüler yuvarlak ya da ovoid protozoanlar olarak gözlenir. Parazitler, bazen dolaşımda hemositler içinde ve adduktor kasının kas hücreleri ile bağdokuda da görülebilir. Mantoda makroskobik olarak gözlenen sarı-yeşil püstüllerde parazitler, dokudaki nekroz ve hemosit infiltrasyonu sahalarında kolayca bulunabilir. Ağır enfekte istiridyelerde ve özellikle hastalığa daha duyarlı bir tür olan *Crassostrea virginica*'da parazit, tüm konakçı dokularında görülebilir.

Sonuçlar, kalitatif olarak (enfekte=pozitif/enfekte olmayan=negatif) ifade edilir. Ayrıca yarıkalitatif skalaya göre de ifade edilebilir.

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- Diagnosis by histo-cytopathology of *Mikrocytos* sp.in oysters. http://wwz.ifremer.fr/crlmollusc/content/download/15855/236768/file/Mikrocytos_2.pdf
- NOAA (1983) Histological Techniques for Marine Bivalve Mollusks, NOAA Technical Memorandum NMFS-F/NEC-25, U.S. Department of Commerce, NOAA, National Marine Fisheries Service, p.97.

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

ÇİFT KABUKLU YUMUŞAKÇALARDA PERKINSOSIS'İN HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSİ

1. AMAÇ

Çift kabuklu yumuşakçalarda (akivades ve diğer klam türleri, *Crassostrea* ve *Pinctada* türü istiridyeler, abalon türleri) Perkinsosis'in yaklaşımsal histopatolojik teşhisidir.

2. UYGULAMA ALANI

Çift kabuklu yumuşakça hastalıklarının histopatolojik muayenesini yapan Bölüm/Laboratuvarlar için geçerlidir.

3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

- ☐ Hastalık izleme amaçlı muayenelerde; yumuşakça örnekleri laboratuvara canlı olarak ulaştırılmalıdır.
- ☐ Yumuşakça kabuklarının açılması sırasında oluşabilecek yaralanmalara karşı dikkatli olunmalıdır.
- ☐ Doku takip işlemlerinde kullanılan özellikle ksilol ve alkol gibi kimyasallar yanıcı, iritan ve solunum ya da sindirim yolu ile toksik olan kimyasallar grubunda yer aldığından çalışma ortamının iyi bir havalandırma sistemine ve en iyisi bir filtre ünitesine sahip olması gereklidir.

5. KISALTMALAR/TANIMLAR

HE: Hematoksilen- Eosin

***Ruditapes decussatus*:** Akivades (carpet shell clam).

***Crassostrea virginica*:** Doğu istiridyesi (Eastern oyster).

***Crassostrea gigas*:** Pasifik istiridyesi (Pasific oyster).

Olgun trofozoit: Parazitin, nükleusu hücrenin bir kenarına itilmiş ve sitoplazmada büyük bir vakuol içeren gelişme formu.

Tomont (Zoosporangium): 8- 32 adet olgunlaşmamış trofozoit kapsayan form.

Perkinsosis: Dünyanın birçok bölgelerinde (Avrupa, Amerika, Asya ve Avustralya) birçok farklı yumuşakça türlerinin (klam, istiridye, abalon) Perkinsus genusundan protistan bir parazit olan *Perkinsus* spp. tarafından meydana getirilen enfeksiyonudur.

Avrupada, *Perkinsus olseni* özellikle *Ruditapes decussatus* ve *Ruditapes philippinarum* başta olmak üzere farklı klam türlerini enfekte eder. Parazite duyarlı konakçılar; klam türlerini (*Anadara trapezia*, *Austrovenus stutchburyi*, *Tapes decussatus*, *Tapes philippinarum*, *Pitar rostrata*) istiridyeleri (*Crassostrea gigas*, *Crassostrea ariakensis*, *Crassostrea sikamea*), inci istiridyeleri (*Pinctada margaritifera*, *Pinctada martensii*) ve abalone (*Haliotis rubra*, *Haliotis laevis*, *Haliotis scalaris*, *Haliotis cyclobates*) türlerini kapsar. Tüm yaş grupları enfeksiyona duyarlıdır. Enfeksiyonun

yoğunluğu, yaşla birlikte artar. Hayat boyu taşıyıcı yumuşakçalar ile persiste enfeksiyonlar oluşabilir. Bulaşma, konakçıdan konakçıya direkttir. Parazitin tüm hayat devreleri enfektifdir. Patojene bir yıldan daha fazla maruz kalanlarda enfeksiyon prevalansı yüksektir. Klam konakçılarda enfeksiyonlar, çevresel koşullara bağlı olarak öldürücü olabilir ve ölümler, enfeksiyondan 1- 2 yıl sonra oluşabilir.

Perkinsus marinus ise Kuzey Amerika'nın doğu sahilleri boyunca enfeksiyona en duyarlı istiridye türü olan *Crassostrea virginica*'da Dermo hastalığı olarak bilinen kitlesel ölümlere yol açar. *Crassostrea gigas* ve *Crassostrea ariakensis* de deneysel olarak enfekte edilebilir ancak hastalık geliştirmezler. *Mya arenaria* ve *Mya balthica* gibi klamlarda ise enfeksiyon prevalansı, %10'un altındadır. *Perkinsus marinus* ile enfeksiyon, Ülkemizde de ihbarı mecburi olan ekzotik bir hastalıktır.

6. TEST METODUNUN KISA TANIMI

Perkinsosis'in yaklaşımsal histopatolojik teşhisi için doku kesitlerinde, hastalık etkeni olan *Perkinsus* spp.'nin varlığının aranmasını kapsar.

7. TEST METODUNUN TANIMI

Davidson solüsyonunda tespit edilen yumuşakça doku örnekleri, rutin histolojik doku işleme yöntemlerine göre işlenerek hazırlanan parafin bloklardan alınan doku kesitleri, HE ile boyanır ve *Perkinsus* spp.'nin varlığı yönünden ışık mikroskobunda muayene edilirler.

7.1. Materyal

Canlı ya da taze ölü yumuşakçaların kabukları açılır, çıkarılan yumuşakçaların solungaçlar, manto ve palpleri kapsayacak şekilde sindirim bezinden geçen dorsoventral bir kesit alınır.

7.1.1. Kullanılan Alet-Ekipman

Doku Takip Cihazı

Doku Gömme Cihazı

Mikrotom

Su banyosu

Etüv

Boyama Cihazı

Binoküler ışık mikroskobu (Histolojik muayeneler için farklı normal kuru objektifler (10X, 20X, 40X) ve immersiyon yağı ile kullanılan objektif (100X) ile donanımlı ve Koehler büyütme tekniğine uyumlu)

7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

7.1.2.1. Dokuların Tespitinde Kullanılan Kimyasallar

Davidson solüsyonu

Deniz suyu	1200 ml
%95 Alkol	1200 ml
%37 formaldehid	300 ml
Gliserol	400 ml
Glasial asetik asit	%10

%10 formalin solüsyonu

Formaldehid %37-40	10 ml
Deniz suyu (filtre edilmiş)	90 ml

7.1.2.2.Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden Arındırılması ve Parafine Gömülmesinde Kullanılan Kimyasallar

96° etanol ve bundan hazırlanan dereceli alkoller

Absolut etanol

Ksilol

Parafin (56-60°C'de eriyebilirlik)

7.1.2.3.Doku Kesitlerinin Boyanmasında Kullanılan Kimyasallar

Hematoksilen

Eosin

Asit alkol

Alkol %70	1000.0 ml
Hidroklorik asit, konsantre	10.0 ml

7.1.2.4.Doku Kesitlerinin Üstüne Lamel Kapatılmasında Kullanılan Kimyasallar

Entellan

7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

7.2.1.Dokuların Tespiti:

Kabukları açılarak çıkarılan yumuşakçaların solungaçlar, manto ve palpleri kapsayacak şekilde sindirim bezinden geçen dorsoventral alınan bir kesit histolojik muayeneler için Davidson solüsyonuna konarak tespit edilir. Tespit amacıyla filtre edilmiş deniz suyundan hazırlanmış %10 formalin solüsyonu da kullanılabilir. Kalan yumuşakça dokuları ise teyitsel teşhis metodlarından PCR-RFLP ve insitu hibridizasyon için -20° C'de ya da %70'lik etanol içinde saklanabilir.

7.2.2.Dokuların Dehidrasyonu, Alkolden arındırılması ve Parafine Gömülmesi:

- Tespit edilen dokular çeşme suyu altında yıkanarak tespit solüsyonundan arındırılır.
- Dokular, Doku Takip Cihazında dereceli alkol serilerinden ve absolut alkollerden geçirilerek önce dehidre edilir ve daha sonra ksilollerden geçirilerek alkolden arındırılırlar.

Etanol 75°	(30 dakika)
Etanol 90	(30 dakika)
Etanol 95	(30 dakika)
Absolut etanol 100	(15 dakika)
Absolut etanol 100	(30 dakika)
Absolut etanol 100	(60 dakika)
Ksilol	(30 dakika)
Ksilol	(60 dakika)
Ksilol	(60 dakika)
Parafin	(45 dakika)
Parafin	(45 dakika)
Parafin	(45 dakika)

- En son parafin kaplarına geçen doku örnekleri, Doku Gömme Cihazında parafine gömülerek soğutulur.

7.2.3.Doku Kesitlerinin Hazırlanması:

Hazırlanan parafin doku bloklarından, her bir yumuşakça için 2 adet olmak üzere mikrotom ile 2-3 µm kalınlığında kesitler alınarak fazla nemi uzaklaştırmak için 56°-60°'lik etüvde kurutulur.

7.2.4.Doku Kesitlerinin Boyanması ve Lamel ile Kapatılması:

- Doku kesitleri, aşağıda belirtilen sıra ve sürelerde önce ksilol ile muamele edilerek parafinden arındırılır, daha sonra absolut etanol'den geçirilerek ksilol giderilir ve çeşme suyuna alınarak doku takip işlemleri sırasında dehidre edilen dokuların tekrar su alması sağlanır.

Ksilol	(15 dakika)
Ksilol	(15 dakika)
Absolut etanol	(15 dakika)
Çeşme suyu	(5 dakika)

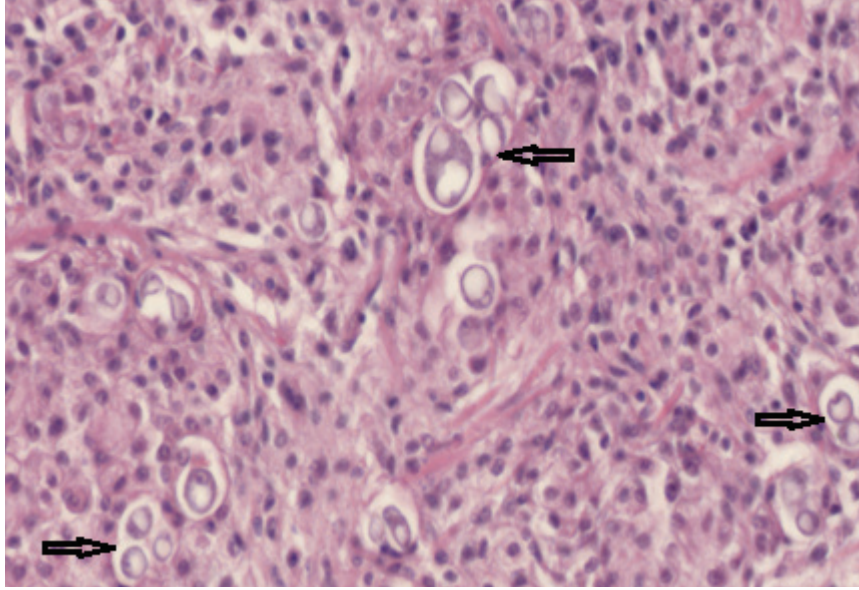
- ☐ Doku kesitlerine HE boyama metodu uygulanır.
 - Hematoksilen (3 dakika 30 saniye)
 - Çeşme suyu (5 dakika)
 - Asit alkol (15 saniye)
 - Çeşme suyu (5 dakika)
 - Eosin (30 saniye)
 - Çeşme suyu (5 dakika)
- ☐ Boyanmış doku kesitleri, absolut alkollerden ve ksilollerden geçirilerek şeffaflandırılır.
 - Absolut etanol (1 dakika)
 - Absolut etanol (1 dakika)
 - Absolut etanol (1 dakika)
 - Ksilol (2 dakika)
 - Ksilol (5 dakika)
- ☐ Boyama süresinin sonunda lamalar, pens ile tutularak teker teker ksilolden alınır. Kesit üzerine pastör pipeti ile 1-2 damla yapıştırıcı konur ve üzerine doku kesitini tamamen içine alacak şekilde lamel kapatılır.

7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi:

Histolojik muayenede; *Akivades* ve diğer duyarlı yumuşakçalarda tüm organların (solungaçlar, ayak, sindirim bezi, gonadlar ve manto) bağdokusunda yoğun heterofil infiltrasyonları ile eşlik edilen *Perkinsus olseni*'nin çeşitli gelişme şekilleri (olgunlaşmamış trofozoitler, 2-40 µm çapında (genelde 5-15 µm), nukleusu hücrenin bir kenarında eksentrik olarak yerleşmiş ve sitoplazmasında büyük bir vakuole sahip olgun trofozoitler ve 2, 4, 8, 16 ya da 32 gelişen trofozoit kapsayan tomont devreleri) gözlenir (Resim 1). Solungaçlar, sindirim bezinin bağdokusu ve ayak en sıklıkla enfekte olan dokulardır. Çoğu enfeksiyonlarda hemosit infiltrasyonu oluşur. Kapsüllenme ve fagositoz yaygındır. Konakçı reaksiyonu, parazitlerin hemositler tarafından çevrilerek sınırlanması şeklindedir. Hemositler, parazitleri yıkıma uğratabilen lizozomal enzimler salgıladığından kısmen ya da tamamen eriyen *Perkinsus* hücreleri, dokuda eosinofilik materyal olarak gözlenir. Enfekte konakçıdaki trofozoitlerin büyüklükleri *Perkinsus marinus*'ta 2-10µm ve *P.olseni/atlanticus*'ta 16µm'den daha büyüktür.

Perkinsus marinus, istiridyelerde hemositler içinde görülebilir. Hafif enfeksiyonlar sadece bağırsak epitelyumunda oluşur. Ağır enfeksiyonlarda ise tüm organların bağdokusunda parazitin gelişme şekilleri görülür.

Sonuçlar, kalitatif olarak (enfekte=pozitif/enfekte olmayan=negatif) ifade edilir. Ayrıca yarı kalitatif skalaya göre de ifade edilebilir.



Resim 1. Bağıdokuda yoğun hemosit infiltrasyonu ve parazitin olgun trofozoit formları (oklar), Perkinsus olseni, HE, x400.

(Bornova Vet. Kont. Ens. Patoloji Bölümü Arşivi)

8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE (2012) Infection with Perkinsus olseni. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/2010/2.4.06_P_OLSENI.pdf
- NOAA (1983) Histological Techniques for Marine Bivalve Mollusks, NOAA Technical Memorandum NMFS-F/NEC-25, U.S. Department of Commerce, NOAA, National Marine Fisheries Service, p.97.
- Perkinsus of Clams and Cockles. Fisheries and Oceans, Canada. http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/sci/shelldis/pages/perkincc_e.htm:

9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

**Histopatolojik İncelemelerde
Kullanılan Cihazlar**
(Ankara Üniversitesi
Veteriner Fakültesi Patoloji
Anabilim Dalı Laboratuvarı)



Histopatolojik İncelemelerde Kullanılan Cihazlar (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı)



Doku Takip Cihazı ---- Doku Gömme Cihazı --- Mikrotom --- Su Banyosu (Ok yönüne göre isimlendirilmiştir)



Otomatik Boyama Cihazı



Boyama Seti



Etüv



Işık Mikroskobu

